



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**IMPLICACIÓN DE LA DISFUNCIÓN DE
LA CADENA RESPIRATORIA
MITOCONDRIAL EN LA
MODULACIÓN DE LA RESPUESTA
INFLAMATORIA EN LA ARTROSIS EN
CONDROCITOS HUMANOS
NORMALES EN CULTIVO. EFECTO DE
LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN
UN MODELO ANIMAL DE
INFLAMACIÓN ARTICULAR**

**TESIS DOCTORAL
CARLOS VAAMONDE GARCÍA
2013**

UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**IMPLICACIÓN DE LA DISFUNCIÓN DE
LA CADENA RESPIRATORIA
MITOCONDRIAL EN LA MODULACIÓN
DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN
LA ARTROSIS EN CONDROCITOS
HUMANOS NORMALES EN CULTIVO.
EFECTO DE LA DISFUNCIÓN
MITOCONDRIAL EN UN MODELO
ANIMAL DE INFLAMACIÓN ARTICULAR**

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

Carlos Vaamonde García

DIRECTORA

María José López Armada

LA CORUÑA, 2013

Dra. **M^a José López Armada**, Investigadora del Programa de Estabilización Miguel Servet,

CERTIFICA:

Como directora de la Tesis Doctoral que lleva por título: **“IMPLICACIÓN DE LA DISFUNCIÓN DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA ARTROSIS EN CONDROCITOS HUMANOS NORMALES EN CULTIVO. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN UN MODELO ANIMAL DE INFLAMACIÓN ARTICULAR”** presentada por el Licenciado en Ciencias Biológicas D. **Carlos Vaamonde García**, que dicho trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña. El presente trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente para optar al grado de doctor por la Universidad de A Coruña.

Y para que así conste firmo el presente informe en A Coruña, a 9 de Septiembre de 2013.

Vº Bº Directora del trabajo

Asdo. Dra María José López Armada
Inflamación y Envejecimiento
Unidad de Investigación-INIBIC
CHU A Coruña

Dra. **M^a Esperanza Cerdán Villanueva**, catedrática en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña,

CERTIFICA:

Como tutora de la Tesis Doctoral que lleva por título: **“IMPLICACIÓN DE LA DISFUNCIÓN DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA ARTROSIS EN CONDROCITOS HUMANOS NORMALES EN CULTIVO. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN UN MODELO ANIMAL DE INFLAMACIÓN ARTICULAR”** presentada por el Licenciado en Ciencias Biológicas D. **Carlos Vaamonde García** que dicho trabajo ha sido realizado bajo mi tutela. El presente trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente para optar al grado de doctor por la Universidad de A Coruña.

Y para que así conste firmo el presente informe en A Coruña, a 9 de Septiembre de 2013.

Vº Bº Tutora del trabajo

Asdo. Dra M^a Esperanza Cerdán Villanueva
Departamento de Biología Celular y Molecular
Universidad de A Coruña

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

El camino personal que uno emprende en algún momento de su vida, puede llegar a ser en ciertos tramos largo, duro e incluso a veces desalentador. Pero si encuentras en él tanta buena gente con quien recorrerlo, habrá valido la pena. Ahora, el final de esta travesía es ya inminente, y antes de comenzar una nueva, me gustaría agradecer a vosotros la ayuda prestada.

En el inicio de todo recorrido necesitas a alguien que te ayude a dar los primeros pasos; esa persona que luego, desde cierta distancia, te recuerda por donde queda la senda segura. Gracias por tanto a mi directora María, por darme esta oportunidad, por tu orientación, y tu paciente labor. No estaría escribiendo esta tesis si no fuera por ti.

Gracias a mi tutora Esperanza Cerdán por su apoyo desinteresado desde la Facultad de Ciencias de la UDC.

Al Doctor Blanco por su respaldo y supervisión.

Gracias a la XUNTA y al Instituto de Salud Carlos III por haberme concedido la financiación necesaria a lo largo de estos años.

A los donantes de cartílago, y al Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña e INIBIC, por proporcionarme las muestras y los medios suficientes con los que poder realizar este trabajo.

A los veterinarios y técnicos de la Unidad de Cirugía Experimental, y especialmente a Eduardo, no hubiese llevado a cabo los experimentos en el modelo animal sin vuestra ayuda.

Gracias a todos mis compañeros del INIBIC, porque todos en algún que otro momento me habéis ayudado:

Dolo, Meriyoun, y Bea L., gracias por vuestra ayuda en la obtención y procesamiento de las muestras.

Las proteómicas (Vale, Bea, Lucia, Carol, Patri, Jesús,... y ex prote Vane).

Los genómicos: Nacho, Ángel, Sara, Tefa, Geni y Merce.

Puri y Noa por la ayuda con los cortes histológicos, tinciones e inmunos.

Al equipo Mayan.

Terapia celular... Tamy, tus ceros fueron una motivación para mejorar.
Los oncológicos, con Mar a la cabeza, gracias por tu extra-ayuda con las inmunos.
A Micro, con la indescrptible y entrañable Eva.
Los que se marcharon: Alex, May, Tere,...
Secretarias: Fani, Pilar, Nati y Emma, gracias por las gestiones de los 'papeleos'.
Y a todos aquellos compañeros o ex- de los que me haya podido olvidar. Perdón.

Y evocando los inicios de esta andadura, no puedo olvidarme del señor Lires, y Bertis. Todo lo que pueda decir siempre será poco: he aprendido, disfrutado, vivido,... tanto con vosotros... No sé si sois conscientes de lo importantes que habéis sido desde los inicios hasta esta última etapa, en la distancia.

Pero los caminos a veces se separan, y aparecen nuevas personas,... Muchas gracias a mis actuales compañeros de grupo, los inflamados. Laurita, infatigable trabajadora, siempre dispuesta a ayudar, mi querida inocentemente optimista, que habría hecho sin ti!. Noa, solo por haber escuchado durante estos años mis divagaciones científicas ya tendrían que darte un premio, gracias por tu paciencia, ayuda, y comprensión. Glosmaina, la piedra inflamatoria, todo dulzura en el fondo, te debo tus consejos estilísticos, procesado de imágenes, 'cesión' de artículos,... y tu 'faint' paciencia que me hace mejorar. Jess E., gracias por colapsarme y ayudarme al mismo tiempo. Sinceramente, no podría haber tenido un equipo mejor.

A Javi, Mariana y Egma, que aunque no formáis parte del grupo inflamatorio, sinceramente como si lo hubieses formado. Gracias por vuestra ayuda, ánimo y amistad.

Dado que no es muy aconsejable 'vivir' en el laboratorio, hay que saber descansar y desconectar, para al día siguiente retomar los experimentos con energías renovadas; gracias a vosotros porque me habéis ayudado muy activamente en ello: Marian, Luis, Marta, Fer, Ruben, Rebe y el inmigrante Pai Mai.

También os quería agradecer desde la distancia física y temporal a vosotros: Vero, Cla, la artista María Maravilla, Alf,...

Gracias a Mari y Ángel, creo que no existe mejor amigo que un hermano, y que sin amistad y alguien con quien compartir el día a día no se pueden lograr grandes cosas.

Y especialmente gracias a mis padres, porque si estoy escribiendo esto en el fondo es gracias a vosotros, porque me habéis proporcionado todo lo que tenéis. Por mucho que pueda decir o hacer nunca voy a poder agradeceróslo, pero lo mínimo al menos es dedicaros esta tesis...

***“...nunca olvides a desenseñar a desaprender
cómo se deshacen las cosas.”***

(Electroduende)

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
1. LA ARTICULACIÓN HUMANA.....	3
1.1. Las articulaciones sinoviales o diartrodiales.....	3
1.2. El cartílago articular.....	4
1.2.1. Composición del cartílago articular	5
1.2.1.a. Condrocitos	5
1.2.1.b. Matriz extracelular	6
1.2.2. Estructura del cartílago articular	8
1.2.3. Cambios fisiológicos en la articulación asociados con la edad	10
1.2.3.a. La inflamación en el envejecimiento	11
1.3. El tejido sinovial	11
2. LA ARTROSIS	12
2.1. Fisiopatología de la artrosis	14
2.1.1. Cambios en el cartílago articular durante el proceso artrósico	15
2.1.2. El tejido sinovial en la artrosis	16
2.2. Mecanismos de destrucción	18
2.2.1. Metaloproteasas de matriz o matrixinas	18
2.2.2. Adamalasinases: Agrecanasas	19
2.3. La inflamación en la artrosis	20
2.3.1. Citoquinas en la artrosis	21
2.3.1.a. La interleuquina 1 β	22
2.3.1.b. El factor de necrosis tumoral α	23
2.3.1.c. La interleuquina 8	24
2.3.2. Eicosanoides y óxido nítrico	25
2.3.2.a. Eicosanoides: Prostaglandinas	25
2.3.2.b. El óxido nítrico	27
3. LA MITOCONDRIA	28
3.1. La cadena respiratoria mitocondrial	29
3.2. Producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria	32
3.2.1. Señalización intracelular mediante ROS	34
3.2.1.a. ROS-NF- κ B	35
3.2.2. Tratamientos anti-oxidantes	36
3.3. La mitocondria en la artrosis	38
3.3.1. Disfunción mitocondrial en la artrosis	38
3.3.1. Modulación de la actividad mitocondrial en la artrosis	40
3.3.1. Disfunción mitocondrial y tejido sinovial	41

4. MODELOS ANIMALES DE ARTROSIS	42
4.1. Modelos de artrosis en rata	42
4.2. Modelos animales de disfunción mitocondrial	43
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	45
III. MATERIALES Y MÉTODOS	51
A. ESTUDIOS EN EXPLANTES DE CARTÍLAGO Y CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS EN CULTIVO	53
1. CULTIVO CELULAR	53
1.1. Obtención de muestras a partir de cartílago articular humano	53
1.2. Cultivo primario de condrocitos articulares	53
1.3. Caracterización de células condrocíticas	53
1.4. Explantes de cartílago articular	54
1.5. Cultivo de una línea celular de condrocitos: T/C-28a2	54
1.6. Condiciones experimentales y estímulos empleados	54
2. TRANSFECCIÓN CELULAR	55
3. CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR E INTEGRIDAD NUCLEAR ...	56
3.1. Ensayo de viabilidad por MTT	56
3.2. Estudio de la integridad nuclear por tinción DAPI	56
4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	57
4.1. Extracción y cuantificación del ARN	57
4.2. Retro-transcripción del ARNm	57
4.3. Cuantificación de la expresión génica mediante PCR a tiempo real	58
5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN PROTEICA Y LIPÍDICA	59
5.1. Cuantificación proteica mediante citometría de flujo	59
5.2. Cuantificación proteica mediante <i>western blot</i>	59
5.2.1. Extracción y cuantificación de los extractos proteicos celulares	60
5.2.2. Separación electroforética SDS-PAGE	60
5.2.3. Transferencia a membrana	61
5.2.4. Inmunodetección	61
5.2.5. Cuantificación y análisis de los datos	61
5.3. Inmunocitoquímica	62
5.4. Cuantificación proteica mediante ELISA: IL-8	62
5.5. Cuantificación fosfolipídica mediante ELISA: PGE ₂	63
6. ENSAYO DE RETARDO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA): ACTIVIDAD DE NF-κB	63
6.1. Extracción y cuantificación de los extractos proteicos nucleares	63
6.2. EMSA	64
7. ESTUDIO DE QUIMIOTAXIS	65
7.1. Aislamiento de células polimorfonucleares	65
7.2. Ensayo de quimiotaxis	65
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
B. ESTUDIOS EN UN MODELO ANIMAL DE DAÑO ARTICULAR	67
1. DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE DAÑO ARTICULAR POR DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	67
1.1. Animales, grupos experimentales y desarrollo del modelo	67

1.2. Sacrificio y obtención y procesados de muestras	68
2. VALORACIÓN MACROSCÓPICA DEL DAÑO ARTICULAR	69
3. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	70
3.1. Procesado histológico de las muestras en parafina	70
3.2. Tinciones histológicas	71
3.2.1. Tinciones histoquímicas	71
3.2.1.a. Hematoxilina-Eosina	71
3.2.1.b. Tricrómico de Masson	71
3.2.1.c. Safranina O-Verde luz	71
3.2.2. Tinciones inmunohistoquímicas	72
3.3. Análisis semi-cuantitativos del grado de daño articular	73
3.3.1. Determinación del grado de daño en el cartílago	73
3.3.2. Determinación del grado de daño sinovial	73
3.3.3. Cuantificación de células PMN en el infiltrado sinovial	74
3.4. Cuantificación de la producción de ROS	75
4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	76
4.1. Estudios de expresión génica	76
4.1.1. Extracción y cuantificación del ARN	76
4.1.2. Retro-transcripción del ARNm	76
4.1.3. Cuantificación de la expresión génica mediante PCR a tiempo real	76
4.2. Estudios de expresión proteica	77
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	78

IV. RESULTADOS 79

A. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DISFUNCIÓN DE LA CRM EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR CITOQUINAS EN EL CONDROCITO ARTICULAR HUMANO <i>IN VITRO</i>	81
1. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN DE LA CRM SOBRE LA EXPRESIÓN DE IL-8 EN CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS	81
1.1. Modulación de la expresión génica de IL-8	82
1.2. Modulación de la expresión proteica de IL-8	83
1.3. Estudios histológicos de IL-8	84
2. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN DE LA CRM SOBRE LA EXPRESIÓN DE IL-8 INDUCIDA POR IL-1 β	84
2.1. Modulación de la expresión génica de IL-8	85
2.2. Modulación de la expresión proteica de IL-8	86
2.3. Ensayo de quimiotaxis	90
3. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2 Y PGE ₂ INDUCIDA POR IL-1 β	91
3.1. Modulación de la expresión génica de COX-2	91
3.2. Modulación de la expresión proteica de COX-2	92
3.3. Modulación de la producción de PGE ₂	93
4. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN DE LA CRM SOBRE EL PÉRFIL INFLAMATORIO INDUCIDO POR TNF- α	94
4.1. Modulación de la expresión génica de IL-8	94
4.2. Modulación de la expresión proteica de IL-8	95
4.3. Modulación de la producción de PGE ₂	97

5. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE LA PROTEÍNA OSCP SOBRE LA EXPRESIÓN INFLAMATORIA INDUCIDA POR IL-1 β EN UNA LÍNEA CELULAR INMORTALIZADA DE CONDROCITOS	98
5.1. Efecto de la inhibición química de la CRM sobre la expresión de IL-8 inducida por IL-1 β	99
5.1.1. Modulación de la expresión génica de IL-8	99
5.1.2. Modulación de la expresión proteica de IL-8	100
5.2. Efecto del silenciamiento de la proteína OSCP sobre la expresión de IL-8 inducida por IL-1 β	101
5.2.1. Valoración de la eficacia de la transfección de siOSCP.....	101
5.2.1.a. Expresión génica de OSCP	101
5.2.1.b. Expresión proteica de OSCP	101
5.2.2. Efecto del silenciamiento de OSCP sobre la expresión de IL-8	102
6. MEDIADORES IMPLICADOS EN EL EFECTO INFLAMATORIO INDUCIDO POR LA DISFUNCIÓN DE LA CRM	103
6.1. Implicación de ROS en la amplificación de la respuesta inflamatoria a citoquinas inducida por la disfunción mitocondrial	104
6.2. Implicación del factor de transcripción NF- κ B en la amplificación de la respuesta inflamatoria a citoquinas inducida por la disfunción mitocondrial	105
6.2.1. Efecto de la disfunción de la CRM en la translocación nuclear de NF- κ B inducida por IL-1 β	105
6.2.2. Efecto de la inhibición de NF- κ B sobre la expresión de IL-8	106
6.3. Implicación de vías de señalización de muerte en la respuesta inflamatoria inducida por la disfunción mitocondrial	108
6.3.1. Estudios de muerte celular	108
6.3.2. Implicación de las caspasas en la producción de PGE ₂ inducida por la inhibición química de la CRM	109
6.3.3. Implicación de las caspasas en la producción de IL-8 inducida por el silenciamiento de la proteína OSCP	110
7. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA A CITOQUINAS INDUCIDA POR LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL	111
7.1. Modulación de la expresión proteica de IL-8	112
7.2. Modulación del poder quimiotáctico de neutrófilos	114
7.3. Modulación de la producción de PGE ₂	115
7.4. Modulación de la expresión de IL-8 inducida por el silenciamiento de OSCP	115
B. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN UN MODELO MURINO <i>IN VIVO</i> DE DAÑO ARTICULAR POR DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	117
1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA	117
2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA	120
2.1. Evaluación del daño en el cartílago	121
2.2. Evaluación del daño en el tejido sinovial	124
2.2.1. Análisis de la presencia de células PMN en el tejido sinovial	125
3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN INFLAMATORIA EN LOS TEJIDOS ARTICULARES	127

3.1. Expresión de mediadores inflamatorios en el cartílago articular	127
3.2. Localización de IL-8 en el tejido sinovial	129
4. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA CRM SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO EN EL TEJIDO SINOVIAL	130
V. DISCUSIÓN	133
A. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DISFUNCIÓN DE LA CRM EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR CITOQUINAS EN EL CONDROCITO ARTICULAR HUMANO <i>IN VITRO</i>	135
B. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN UN MODELO MURINO <i>IN VIVO</i> DE DAÑO ARTICULAR POR DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL	149
VI. CONCLUSIONES	157
VII. BIBLIOGRAFÍA	161
VIII. ANEXOS	185

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

-OH	Radical hidróxido
AA	Antimicina A
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
ADAMTS	Adamalisina-Trombospondina
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
ADNmt	Ácido desoxiribonucleico mitocondrial
AINEs	Anti-inflamatorios no esteroideos
AGE	Productos finales de glicosilaciones no enzimáticas
AMPK	Quinasa activada por monofosfato de adenina
AP-1	Proteína activadora 1
AR	Artritis reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
BMP	Proteína morfogénica de hueso
BSA	Albúmina bovina
CCL	Ligando de la quimioquina tipo C-C
CINC	Quimioatrayente de neutrófilos inducido por citoquinas
cNOS	Isoforma constitutiva de la sintetasa del óxido nítrico
COX	Ciclooxygenasa
CRM	Cadena respiratoria mitocondrial
DAB	3,3-diaminobenzidina tetraclorhidrato
DAMP	Patrón molecular asociado a daño
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol
DDAH-2	Dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2
DHE	Dihidroetidio
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilenominotetraacético
EE	Error estandar
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
EMSA	Ensayo de retardo en gel
FAD	Flavina-Adenina-Dinucleótido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gramos
GAG	Glucosaminoglicanos
h	Horas
H&E	Hemoxilina-Eosina
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1
HMGB1	Proteína 1 del grupo de alta movilidad

HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa
ICE	Enzima de conversión de IL-1 β
IGF-1	Factor de crecimiento tipo insulina 1
IL	Interlequina
IL-1ra	Receptor antagonista de interleuquina-1
iNOS	Isoforma inducible de la sintetasa del óxido nítrico
JNK	Quinasa JUN N-terminal
l	Litros
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramos
min	Minutos
mitNOS	Isoforma mitocondrial de la sintetasa del óxido nítrico
ml	Mililitros
MMP	Metaloproteasas
MTT	3-5 [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil bromuro de tetrazolio
NAC	N-Acetilcisteína
NAD	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido
NF-κB	Factor nuclear κ B
ng	Nanogramos
NFPs	Péptidos N-formil
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintetasa del óxido nítrico
O₂⁻	Anión superóxido
O₂	Oxígeno
OA	Artrosis
°C	Grados centígrados
OLI	Oligomicina
ONOO⁻	Peroxinitrito
OSCP	Proteína que confiere sensibilidad a oligomicina
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógeno
PBGD	Porfobilinógeno deaminasa
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PGE	Prostaglandina E
Pi	Fosfato
PiT-1	Transportador de fosfatos
PKC	Quinasa proteica C
PMN	Polimorfonucleares
PMSF	Fenilmetilsulfonil
POLG	ADN polimerasa mitocondrial γ
PSA	Persultato amónico

PVDF	Fluoruro de polivinilideno
Q	Ubiquinona
QH₂	Ubiquinol
RAGE	Receptor de productos finales de glicosilaciones
RANTES	Quimioquina expresada y secretada por células T y regulada por activación
REDOX	Reducción-Oxidación
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RSV	Resveratrol
RT	Transcripción reversa
SBF	Suero de bovino fetal
SDS	Sodio dodecil sulfato
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
siARN	Silenciador de ARN
SOD	Superóxido dismutasa
sTNF-R	Receptor soluble del factor de necrosis tumoral
SV40	Virus Simian 49
TACE	Enzima convertidora de TNF- α
TEMED	N,N' metilen-bis-acrilamida
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral β
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteasa de matriz
TLR	Receptor tipo <i>toll</i>
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
UCP-3	Proteína desacopladora 3 mitocondrial
UV	Ultravioleta
V	Voltios
vs.	Versus
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
μg	Microgramos
μl	Microlitros

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de una articulación de rodilla humana	4
Figura 2	Cartílago articular humano	6
Figura 3	Composición y disposición del proteoglicano agrecano	8
Figura 4	Actividad funcional de los proteoglicanos	8
Figura 5	Estructura del cartílago articular	9
Figura 6	Imagen representativa de un tejido sinovial	12
Figura 7	Patología de la artrosis	13
Figura 8	Representación esquemática de las interacciones entre los diferentes tejidos que componen la articulación	15
Figura 9	Morforlogía del cartílago articular humano normal y artrósico	16
Figura 10	Tejido sinovial humano normal y artrósico	17
Figura 11	Balance de citoquinas en la artrosis	21
Figura 12	Estructura de las quimioquinas	24
Figura 13	Ruta de síntesis de las prostaglandinas	26
Figura 14	Estructura de la mitocondria	29
Figura 15	Complejos respiratorios mitocondriales y transporte de electrones	32
Figura 16	Formación de ROS en la mitocondria	34
Figura 17	Activación de NF- κ B	35
Figura 18	Estructura molecular del resveratrol	37
Figura 19	Aspecto al microscopio óptico de los condrocitos humanos en cultivo (A) y la línea celular de condrocitos T/C-28a2 (B)	54
Figura 20	Esquema del desarrollo del modelo animal de daño articular	69
Figura 21	Corte frontal de una articulación trasera de rata	70
Figura 22	Tinción con Hematoxilina-Eosina de tejido sinovial patológico	74
Figura 23	Imagen representativa de la presencia de infiltrado en tejido sinovial en un corte histológico teñido con Hematoxilina-Eosina ...	75
Figura 24	Expresión del ARNm de IL-8 en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	82
Figura 25	Producción de IL-8 en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	83
Figura 26	Producción de IL-8 en explantes de cartílago sometidos a la disfunción de la CRM	84
Figura 27	Expresión del ARNm de IL-8 inducido por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	85
Figura 28	Expresión proteica de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Estudios de dosis-dependencia	86
Figura 29	Expresión proteica de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	87

Figura 30	Análisis inmunocitoquímico de la expresión de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	88
Figura 31	Producción de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	89
Figura 32	Producción de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Estudios tiempo-dependencia	89
Figura 33	Estudio de quimiotaxis de neutrófilos inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	90
Figura 34	Expresión del ARNm de COX-2 inducido por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	92
Figura 35	Expresión proteica de COX-2 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	92
Figura 36	Ejemplo de citometría de flujo mostrando la expresión proteica de COX-1 y COX-2 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	93
Figura 37	Producción de PGE ₂ inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	94
Figura 38	Expresión del ARNm de IL-8 inducido por TNF- α en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	95
Figura 39	Producción de IL-8 inducida por TNF- α en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	96
Figura 40	Expresión proteica de IL-8 inducida por TNF- α en condrocitos sometidos a la disfunción en la CRM	97
Figura 41	Producción de PGE ₂ inducida por TNF- α en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	98
Figura 42	Expresión del ARNm de IL-8 inducido por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Estudios tiempo-dependencia	99
Figura 43	Producción de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos T/C-28a2 sometidos a la disfunción de la CRM. Estudios de dosis- y tiempo-dependencia	100
Figura 44	Eficacia de la transfección con ARN de interferencia de OSCP en condrocitos T/C-28a2. Expresión del ARNm de OSCP	101
Figura 45	Eficacia de la transfección con ARN de interferencia de OSCP en condrocitos T/C-28a2. Expresión de la proteína OSCP	102
Figura 46	Efecto de la supresión de OSCP en la producción de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos T/C-28a2	103
Figura 47	Efecto de N-acetilcisteína sobre la expresión proteica de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	104
Figura 48	Ejemplo de citometría de flujo evaluando la expresión de IL-8 bajo la reducción en los niveles de ROS	105
Figura 49	Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la activación de NF- κ B inducida por IL-1 β en condrocitos humanos en cultivo.....	106
Figura 50	Efecto de Bay-117082 sobre la expresión proteica de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	107

Figura 51	Ejemplo de citometría de flujo evaluando la expresión de IL-8 bajo la inhibición de actividad nuclear de NF- κ B	107
Figura 52	Valoración de la muerte celular en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	109
Figura 53	Efecto de la inhibición de la actividad de las caspasas 3/7 sobre la producción de PGE ₂ en condrocitos sometidos a la disfunción de su CRM	110
Figura 54	Efecto de la inhibición de las caspasas sobre la producción de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos T/C-28a2 transfectados con siOSCP	111
Figura 55	Efecto de RSV sobre la expresión proteica de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	112
Figura 56	Ejemplo de citometría de flujo evaluando la expresión de IL-8 bajo el tratamiento con RSV	113
Figura 57	Efecto de RSV sobre la producción de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a una disfunción en la CRM	113
Figura 58	Efecto de RSV sobre la quimioataxis de neutrófilos inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	114
Figura 59	Efecto de RSV sobre la producción de PGE ₂ inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	115
Figura 60	Efecto de RSV sobre la producción de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos T/C-28a2 transfectados con siOSCP	116
Figura 61	Evolución del diámetro articular durante el desarrollo del modelo	118
Figura 62	Macroscopía de la articulación cerrada de la rodilla de los animales en el momento de su sacrificio	119
Figura 63	Tallado y localización de las zonas de interés en un corte histológico teñido con H&E de una articulación de rodilla de una rata sana	120
Figura 64	Histopatología de articulaciones de rodilla de rata	122
Figura 65	Evaluación del daño en el cartílago articular de rodillas de rata	123
Figura 66	Pannus sinovial invasivo en una articulación de rodilla de rata inyectada intraarticularmente con LPS	124
Figura 67	Determinación del grado de daño sinovial	125
Figura 68	Evaluación del porcentaje de células PMN en el infiltrado sinovial	126
Figura 69	Expresión génica de mediadores inflamatorios en el cartílago articular	128
Figura 70	Producción de CINC-1 en explantes de cartílago de rata	128
Figura 71	Evaluación de la expresión de IL-8 en el tejido sinovial	129
Figura 72	Cuantificación de la expresión de IL-8 en el tejido sinovial	130
Figura 73	Determinación de los niveles de ROS intracelulares en el tejido sinovial	131
Figura 74	Imágenes representativas de los niveles de ROS detectados en el tejido sinovial	131
Figura 75	Ruta teórica sobre el efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria en condrocitos articulares humanos	148

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Cambios en el cartílago durante el envejecimiento que contribuyen al desarrollo de la artrosis	10
Tabla 2	Características de la inflamación en el envejecimiento	11
Tabla 3	Características de los diferentes animales empleados en los modelos de artrosis en relación con la especie humana	43
Tabla 4	Lista de estímulos y concentraciones empleadas en las diferentes condiciones experimentales	55
Tabla 5	Lista de cebadores empleados para la obtención de los productos de amplificación de interés	58
Tabla 6	Composición de los tampones empleados en la realización de la técnica western blot	60
Tabla 7	Composición de los tampones empleados en la preparación de los geles utilizados en la separación electroforética	60
Tabla 8	Lista de anticuerpos empleados en este estudio en la técnica de western blot	61
Tabla 9	Reactivos empleados para la separación electroforética de los extractos nucleares	65
Tabla 10	Detalle del programa utilizado en la inclusión en parafina de las articulaciones	70
Tabla 11	Análisis semi-cuantitativo del grado de daño en el cartílago	73
Tabla 12	Análisis semi-cuantitativo del grado de daño sinovial	74
Tabla 13	Lista de cebadores empleados para la obtención de los productos de amplificación de interés	77
Tabla 14	Neutralización de la actividad quimiotáctica de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM	91

RESUMEN

La artrosis (OA) es la patología articular más frecuente en la población, afectando a más del 70% de los mayores de 65 años. Esta enfermedad se caracteriza por la degradación progresiva del cartílago articular hialino, engrosamiento del hueso subcondral y un grado variable de inflamación sinovial. Actualmente hay un consenso general señalando a la inflamación como factor clave en su progresión, siendo las citoquinas interleuquina 1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) dos de los principales mediadores implicados en esta patología.

Diversos estudios *ex vivo* e *in vitro* han demostrado que los condrocitos humanos artrósicos tienen alterada la función mitocondrial. Esta disfunción mitocondrial puede afectar a varias de las vías patológicas que median en la degradación del cartílago, destacando la respuesta defectuosa del condrocito al crecimiento y a la biosíntesis de su matriz, el incremento de la apoptosis en el condrocito y la calcificación de la matriz del cartílago; así como un incremento de la respuesta inflamatoria y destructiva. En relación con el tejido sinovial, existe una asociación entre la mutagénesis mitocondrial y la respuesta inflamatoria en la artritis inflamatoria. Además, se ha observado que diversos mediadores inflamatorios presentes en el tejido artrósico, como IL-1 β y TNF- α , pueden alterar la función mitocondrial tanto en el condrocito como en el sinoviocito. Por todo ello, la importancia de la mitocondria y la respuesta inflamatoria en el desarrollo de la OA es evidente.

En este trabajo, se demuestra por primera vez que la disfunción mitocondrial amplifica la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas en condrocitos humanos normales *in vitro*, reforzándose la hipótesis de que un daño en la función mitocondrial puede participar activamente en el fenotipo inflamatorio observado en el condrocito artrósico. Este efecto es mediado, al menos en parte, por un incremento del estrés oxidativo y de la activación del factor nuclear NF- κ B, así como de la activación de las caspasas. Además, el resveratrol, una molécula anti-oxidante y anti-inflamatoria, presente en algunos alimentos como las uvas y derivados, es capaz de reducir la respuesta catabólica inducida por la sinergia entre la disfunción mitocondrial y las citoquinas; consolidándose como una molécula prometedora para fines terapéuticos y preventivos en la OA. Finalmente, en este estudio se desarrolla *in vivo* un modelo articular murino de daño mitocondrial, demostrándose que la disfunción mitocondrial en los tejidos articulares puede provocar la destrucción articular, al incrementar la respuesta inflamatoria.

RESUMO

A artrose (OA) é a patoloxía articular mais frecuente na poboación, afectando a máis do 70% dos maiores de 65 anos. Esta enfermidade caracterízase pola degradación progresiva da cartilaxe articular hialina, engrosamento do óso subcondral e un grado variable de inflamación sinovial. Actualmente hai un consenso xeral que sinala á inflamación como factor clave na súa progresión, sendo as citoquinas interleuquina 1 β (IL-1 β) e o factor de necrose tumoral α (TNF- α) dous dos principais mediadores implicados nesta patoloxía.

Diversos estudos *ex vivo* e *in vitro* demostraron que os condrocitos humanos artrósicos teñen alterada a función mitocondrial. Esta disfunción mitocondrial pode afectar a varias das vías patolóxicas que median a degradación da cartilaxe, destacando a resposta defectuosa do condrocito ó crecemento e á biosíntese da matriz, o incremento da apoptose no condrocito e a calcificación da matriz da cartilaxe; así como un incremento da resposta inflamatoria e destrutiva. En relación ó tecido sinovial, existe unha asociación entre a mutaxénese mitocondrial e a resposta inflamatoria na artrite inflamatoria. Ademais, observouse que diversos mediadores inflamatorios presentes no tecido artrósico, coma IL-1 β e TNF- α , poden alterar a función mitocondrial tanto no condrocito coma no sinoviocito. Por todo iso, a importancia da mitocondria e a resposta inflamatoria no desenvolvemento da OA é evidente.

Neste traballo, demóstrase por primeira vez que a disfunción mitocondrial amplifica a resposta inflamatoria inducida por citoquinas en condrocitos humanos normais *in vitro*, reforzando a hipótese de que un dano na función mitocondrial pode participar activamente no fenotipo inflamatorio observado no condrocito artrósico. Este efecto é mediado, polo menos en parte, por un incremento do estrés oxidativo e da activación do factor nuclear NF- κ B, así coma da activación das caspasas. Ademais, o resveratrol, unha molécula anti-oxidante e anti-inflamatoria, presente nalguns alimentos como as uvas e derivados, é capaz de reducir a resposta catabólica inducida pola sinerxia entre a disfunción mitocondrial e as citoquinas; consolidándose como unha molécula prometedora para fins terapéuticos e preventivos na OA. Finalmente, neste estudo desenvólvese *in vivo* un modelo articular murino de dano mitocondrial, demostrándose que a disfunción mitocondrial nos tecidos articulares pode provocar a destrución articular, ó incrementar a resposta inflamatoria.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disease, affecting 70% of people over 65 years old. This disease is characterized by a gradual loss articular cartilage integrity, subcondral bone sclerosis and a variable grade of synovial inflammation. Currently, it is known that inflammation plays an important role in the disease progresion, and interleukin 1 β (IL-1 β) and tumoral necrosis factor α (TNF- α) are considered the main cytokines involved in this pathology.

An increasing number of *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that osteoarthritic human chondrocytes present an altered mitochondrial function. This mitochondrial dysfunction may affect several pathways that have been implicated in cartilage degradation, including defective chondrocyte biosynthesis and growth responses, increased condrocyte apoptosis and matrix calcification; as well as an increment in destructive and inflammatory response. In relation to synovial tissue, an asociation between mitochondrial mutagenesis and inflammatory response has been described in inflammatory arthritis. Furthermore, diverse pro-inflammatory mediators found in the osteoarthritic condition, such as IL-1 β and TNF- α , could alter mitochondrial function in the condrocyte and synoviocyte. Therefore, the role of the mitochondrion and inflammatory pathways in the pathogenesis of OA is evident.

In this study, we demonstrate for the first time that mitochondrial dysfunction amplifies the inflammatory response induced by cytokines in human normal chondrocytes *in vitro*, supporting the hypothesis that damage in mitochondrial function could actively participate in the inflammatory phenotype observed in the osteoarthitic chondrocyte. This effect is mediated, at least partially, by an increase in oxidative stress, activation of the nuclear factor NF- κ B and caspase activation. Furthermore, resveratrol, an anti-oxidant and anti-inflammatory molecule, found in certain foods such as black grapes and derivatives, is able to reduce the catabolic response induced by the synergy between mitochondrial dysfunction and cytokines. This finding confirms resveratrol as a hopeful molecule in preventive and therapeutical treatments in OA. Finally, in this thesis an *in vivo* murine model of articular mitochondrial damage was also developed, showing that mitochondrial dysfunction in articular tissues may trigger the joint destruction by increasing the inflammatory response.



I.

INTRODUCCIÓN

Imagen obtenida y modificada de <http://www.exelans.org/800-600-wallpaper/monolith.html>

1. LA ARTICULACIÓN HUMANA

La articulación se define anatómicamente como el medio de contacto entre las superficies de los huesos próximos que componen el esqueleto humano. Forma parte del aparato locomotor, el cual se encarga de dar soporte, protección y movimiento al cuerpo humano.

Aunque el movimiento de los huesos en una articulación depende en gran medida de la actividad del músculo esquelético insertado en ellos, generalmente el tipo de movimiento o el grado de libertad de los mismos está determinado por la naturaleza de la unión entre los huesos y la forma de las superficies articulares que los componen. De esta forma, en el cuerpo humano existen 3 tipos de articulaciones: sin movilidad (*sinartrosis*), las encontramos entre los huesos del cráneo; con escaso movimiento (*anfiartrosis*), en ellas las superficies articulares están unidas fundamentalmente por tejido fibrocartilaginoso, a este tipo pertenecen las vértebras o los huesos coxales; y con amplia libertad de movimiento (*diartrosis*), son las más comunes en nuestro organismo, un ejemplo de ellas son: el hombro, la cadera o la rodilla.

Además, y teniendo en cuenta sus características anatómicas, también podemos clasificarlas en: *fibrosas*, en ellas los huesos están unidos directamente por tejido conjuntivo fibroso y no poseen cavidad articular; *cartilaginosas*, como las anteriores no contienen cavidad articular y sus huesos están unidos por cartílago; y *sinoviales*, caracterizadas por la presencia de cavidad articular; y por tanto, de tejido sinovial (De Toro FJ y Galdo-Fernández F, 2002). Estas últimas serán el objeto de nuestro estudio.

1.1. Las articulaciones sinoviales o diartrodiales

Como hemos mencionado son las más abundantes en nuestro organismo y las que permiten una o más clases de movimientos (flexión y extensión, abducción y aducción, rotación y circunducción,...). La articulación sinovial está formada por las siguientes estructuras (**figura 1**), cada una de las cuales ejerce una función específica:

Cápsula articular

Es la principal estructura de protección, envuelve toda la cavidad articular uniendo los huesos de la articulación. Está compuesta de dos capas, una externa de naturaleza fibrosa, muy resistente y poco elástica; y una interna, el tejido sinovial.

Tejido y líquido sinovial

El tejido sinovial es una membrana delgada, transparente y vascularizada que reviste toda la articulación al estar adherida a la cara profunda de la membrana fibrosa. Este tejido secreta al espacio articular un líquido transparente y viscoso, denominado líquido sinovial, cuya misión es lubricar y

amortiguar las presiones a las que está sometida la articulación, además de contribuir a la nutrición y oxigenación del cartílago articular.

Cartílago articular

El cartílago articular está recubriendo la superficie de los huesos, y al igual que el líquido sinovial, favorece el deslizamiento entre las superficies articulares y se encarga de amortiguar las presiones generadas durante el movimiento articular.

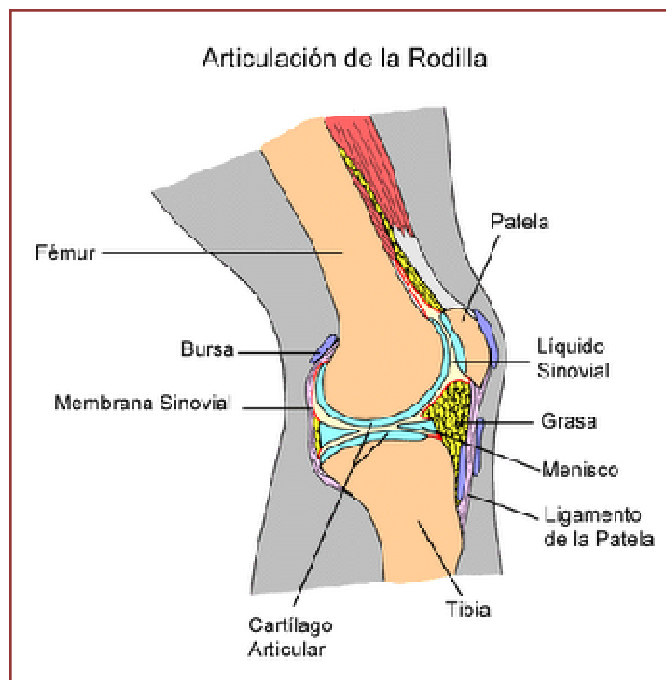


Figura 1: Esquema de una articulación de rodilla humana. En la imagen se pueden observar las partes que componen una articulación sinovial. Imagen obtenida de la página web: <http://pacientesonline.com.ar>

1.2. El cartílago articular

En el ser humano existen tres tipos de cartílago: *elástico*, *fibroso* o *fibrocartílago* e *hialino* o *articular* (Jeffrey y Watt, 2003). El cartílago *elástico* se localiza en la epiglotis, laringe o pabellón auditivo. El cartílago *fibroso* se encuentra en los discos intervertebrales, meniscos y en la articulación temporomandibular. Por último, el cartílago *hialino* es el más abundante en el cuerpo humano y se localiza fundamentalmente en las epífisis óseas de las articulaciones sinoviales; de ahí, que también se le conozca con el nombre de cartílago *articular*. Es un tejido liso de color blanquecino con un grosor entre 1 y 5 mm y con un papel funcional determinante al proteger a las superficies óseas del contacto de las articulaciones sinoviales. Esta protección es posible por la presencia de una superficie lisa que permite el deslizamiento de las superficies óseas con un coeficiente de fricción extremadamente bajo; así como, por sus propiedades de resistencia a las fuerzas de compresión y elasticidad que permiten la amortiguación del impacto

producido durante el movimiento articular. Estas cualidades físicas resultan de la composición y estructura propias del cartílago articular.

1.2.1. Composición del cartílago articular

El cartílago articular es un tejido conectivo especializado, avascular, aneural y alinfático. Está compuesto por un único y reducido número de células, los condrocitos, y por una abundante matriz extracelular (MEC), firme y flexible que le permite resistir las fuerzas mecánicas.

La capacidad del cartílago para soportar las grandes presiones generadas durante la carga reside en las complejas interacciones entre los distintos componentes de su MEC, que el propio condrocito tiene la capacidad de sintetizar. Debido al uso continuo de la articulación, la superficie articular requiere una renovación constante de las macromoléculas que lo componen. Es por ello que el cartílago articular debe de estar sujeto a un perfecto equilibrio entre los procesos anabólicos (síntesis de MEC) y catabólicos (degradación y pérdida de matriz). En este sentido, la alteración del balance entre los procesos anabólicos y catabólicos de la MEC, con un incremento del metabolismo catabólico, da lugar a la pérdida de la integridad del cartílago y en consecuencia de la funcionalidad articular.

1.2.1.a. *Condrocitos*

El condrocito es el único tipo celular presente en el cartílago articular adulto. Como ya se ha descrito, su número es reducido, únicamente representa el 2-3% del volumen total del cartílago, y además, este número se reduce con la edad (Loeser, 2010). Estas células se encuentran ubicadas en la unidad funcional del cartílago, el condrón, formado por el condrocito, la laguna (espacio que ocupa dentro de la matriz) y la matriz, cuyos componentes él mismo sintetiza. A su vez, el conjunto de condrones situados en una proximidad directa dentro de una gran laguna se denomina clúster (**figura 2**). Los condrocitos varían en tamaño, forma y número desde la superficie hasta las capas más profundas del cartílago. En relación a su actividad metabólica, y debido al escaso aporte de oxígeno, poseen un bajo número de mitocondrias, aunque se puede advertir un retículo endoplásmico y aparato de Golgi bien desarrollado en las células situadas en la capa profunda no calcificada del cartílago (Blanco y Fernández-Sueiro, 1998).

A pesar de la relativa quiescencia del condrocito maduro, este es capaz de responder a estímulos bioquímicos, estructurales o físicos, sintetizando distintas enzimas, factores de crecimiento, citoquinas y componentes de la MEC. Sin embargo, esta capacidad de sintetizar MEC y responder a los estímulos anabólicos disminuye con la edad.

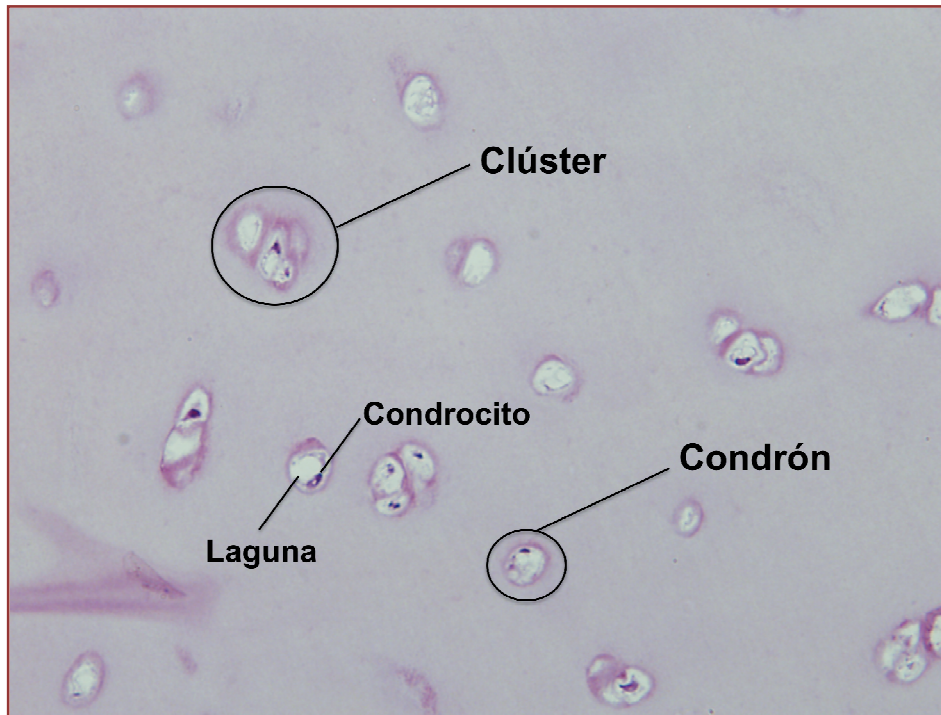


Figura 2: Cartílago articular humano. En la imagen se observan condrocitos embebidos en la matriz del cartílago, y su disposición en condrones dentro de un espacio denominado laguna. A su vez, la unión de varios condrones constituye un clúster.

1.2.1.b. Matriz extracelular

La MEC está constituida por una fracción líquida (70-80%) y un armazón sólido (20-30%) de macromoléculas que proporcionan al cartílago sus características biomecánicas específicas (Bhosale y Richardson, 2008).

- *Fracción líquida*

El agua contribuye casi al 80% del peso total del cartílago articular. El contenido de agua de la matriz del cartílago se distribuye de forma desigual. Su concentración es más elevada en la superficie y disminuye gradualmente hacia la profundidad. La interacción del agua con las macromoléculas de la matriz influye sustancialmente en las propiedades mecánicas del tejido. La alta densidad de cargas negativas procedentes de los proteoglicanos atraen y retienen a las moléculas de agua en la MEC, aportándole al tejido elasticidad, flexibilidad y su capacidad de reducir el rozamiento y distribución de presiones. Además, también contribuye a la nutrición y lubricación tisular.

- *Macromoléculas estructurales*

- Componente fibrilar: colágeno

La red de fibrillas del colágeno representa el 50% del peso seco y constituye el principal armazón del cartílago al proporcionar una estructura de organización para los proteoglicanos y los condrocitos. En el cartílago coexisten diferentes tipos de colágeno

(II, VI, IX, XI, XII, XIV); sin embargo, el 90-95% es de tipo II. Este tipo de colágeno está formado por 3 cadenas- α -1 en una molécula triple helicoidal, que se organiza según un entramado tridimensional, a modo de malla, orientado para descargar las fuerzas de tracción y proporcionar así la resistencia a la tensión. Por otra parte, destacar a los colágenos tipo IX y XI por ser relativamente específicos del cartílago, mientras que el resto puede encontrarse en otros tejidos conectivos. El colágeno tipo IX, que interacciona con el condroitín-sulfato, puede tener una función intermedia entre las de las fibras de colágeno tipo II y los proteoglicanos, contribuyendo así a las propiedades de estabilidad y de resistencia del tejido (Benito, 2002). El colágeno tipo VI, localizado en forma de microfibrillas alrededor de los condrocitos, puede jugar algún papel en la conexión celular.

- Componente no fibrilar: proteoglicanos

Estas macromoléculas constituyen el 30-35% del peso seco. Están formadas por una proteína central a la que se unen covalentemente numerosas cadenas de glucosaminoglicanos (GAG), se disponen entre las fibras de colágeno y son altamente hidrófilas. Los principales GAGs que suelen estar asociados a este eje son los polisacáridos condroitín sulfato, dermatán sulfato y el queratán sulfato.

El agrecano es el proteoglicano más común y mejor definido del cartílago articular, y está compuesto en su mayoría por el condroitín sulfato. El ácido hialurónico, otro GAG producido por el condrocito, tiene la función de enlazar entre sí a través de un enlace proteico diversos proteoglicanos como los agrecanos, formando así numerosos agregados (**figura 3**) que ocupan los espacios entre las redes de fibrillas de colágeno (Jeffrey y Watt, 2003).

La distribución, arquitectura y organización de los proteoglicanos mantiene una concentración elevada de cargas negativas en su superficie, las cuales son en su mayoría aportadas por los GAGs. Las fuerzas repelentes de los grupos con cargas negativas hacen que los proteoglicanos se dispersen y expandan, hasta que las fuerzas elásticas se equilibran debido a la acción de las fuerzas tensionales de las fibras de colágeno. Este mecanismo de dispersión-compresión es el que le confiere la elasticidad y condiciona, desde la superficie articular, la penetración de solutos a través de la matriz (**figura 4**). La composición de los monómeros de proteoglicanos cambia durante el envejecimiento. Con la edad disminuye la proporción de condroitín sulfato y aumenta la cantidad de queratán sulfato y de ácido hialurónico (Martel-Pelletier et al., 2008).

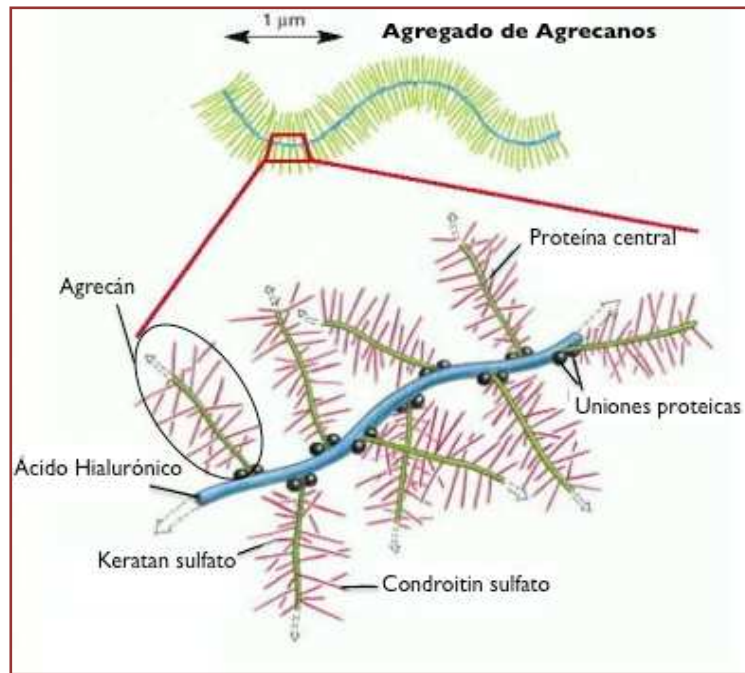


Figura 3: Composición y disposición del proteoglicano agrecano. Los agrecanos están formados en su mayoría por el GAG condroitín sulfato unidos entre sí por una proteína central. Todos ellos a su vez se asocian con otro GAG, el ácido hialurónico, formando agregados de agrecanos. Imagen obtenida de la página web: <http://sph.sagepub.com>.

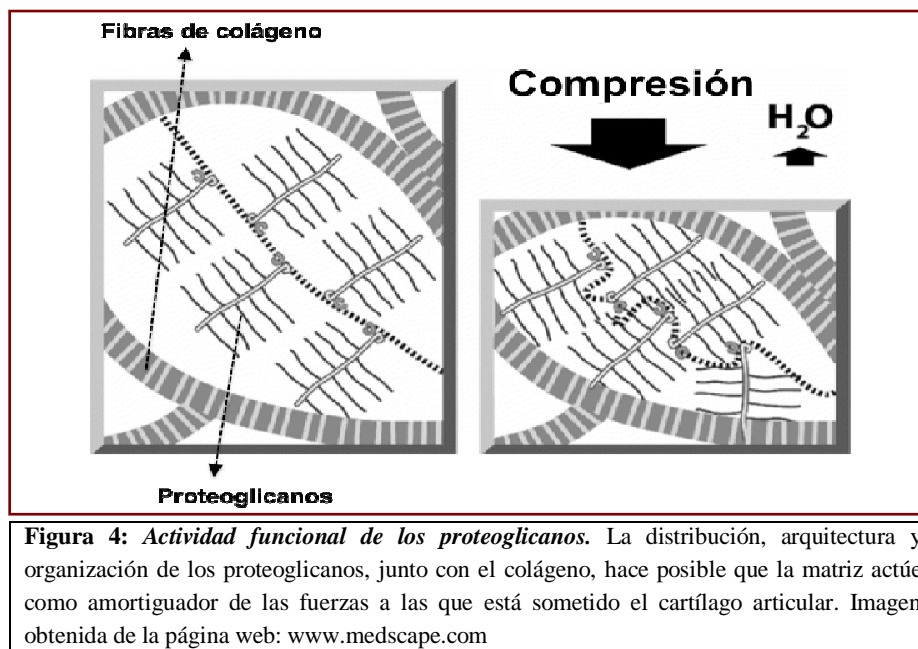


Figura 4: Actividad funcional de los proteoglicanos. La distribución, arquitectura y organización de los proteoglicanos, junto con el colágeno, hace posible que la matriz actúe como amortiguador de las fuerzas a las que está sometido el cartílago articular. Imagen obtenida de la página web: www.medscape.com

1.2.2. Estructura del cartílago articular

En el cartílago articular se pueden distinguir cuatro zonas en función del tamaño, forma y número de los condrocitos; así como del contenido de la MEC, lo que les confiere diferentes propiedades mecánicas (Bhosale y Richardson 2008; Broom, 1984). La transición entre las zonas I, II y III no está bien delimitada (**figura 5**) sino que existe un cambio gradual.

Únicamente, entre la capas III y IV se define una clara línea de separación denominada frente de calcificación (*tide mark*).

- **Zona I, superficial o tangencial:** constituye el 10-20% de grosor del cartílago, en ella los condrocitos son más pequeños, aplanados y alargados, y están situados de forma paralela a la superficie articular. Presenta pocos proteoglicanos y una elevada concentración de fibras de colágeno, de grosor muy fino y paralelas a la superficie, lo que le proporciona una gran resistencia a la erosión.

- **Zona II, media o de transición:** representa entre el 40 a 60% del grosor total. Los condrocitos son algo más grandes, esféricos y se encuentran solos o en grupos, condrones, distribuidos al azar. Existe una mayor presencia de proteoglicanos, y un descenso en el número de fibras de colágeno, que en esta capa se disponen de forma oblicua a la superficie, lo cual facilita soportar las fuerzas de compresión.

- **Zona III, profunda o radial:** ocupa el 30% del grosor. En ella, los condrocitos son más elípticos, formando columnas perpendiculares a la superficie articular. Es rica en proteoglicanos y en unas fibras de colágeno de mayor diámetro que se distribuyen radialmente formando arcos.

- **Zona IV o calcificada:** se encuentra adyacente al hueso subcondral y contiene cristales de hidroxipatita, sirviendo de anclaje entre el cartílago y el hueso. Los condrocitos están esparcidos y en menor número. No presenta proteoglicanos y la concentración de colágeno es menor y dispuesta radialmente. Esta capa se encuentra separada de la profunda por el frente de calcificación, una barrera ondulada con disposición tangencial de sus fibras. Esta capa actúa como un importante amortiguador entre el cartílago articular no calcificado y el hueso subcondral (Goldring, 2000).

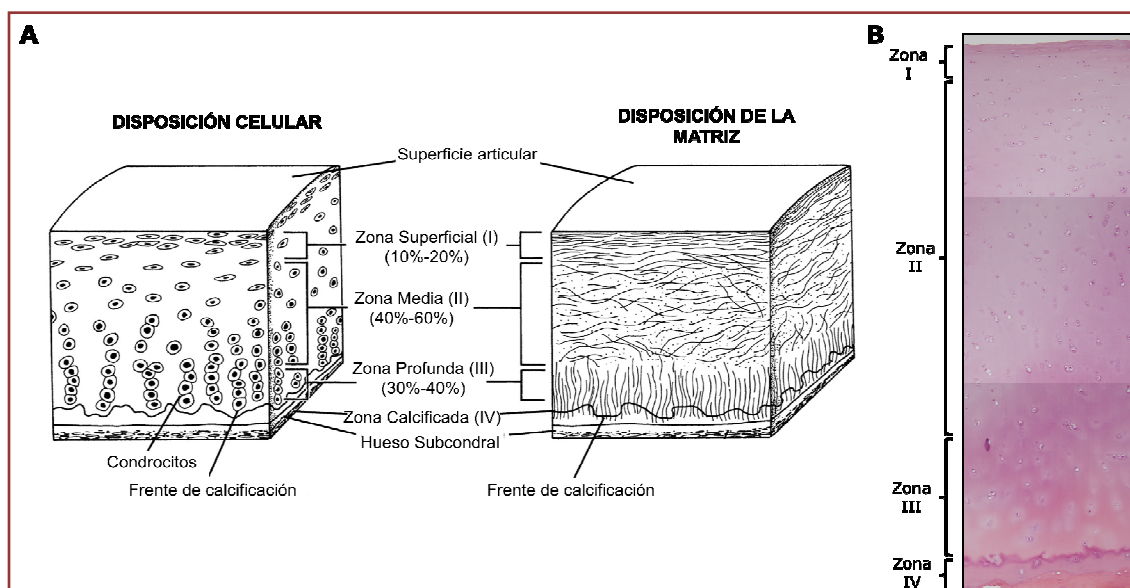


Figura 5: Estructura del cartílago articular. A. Disposición de las células y de la matriz en las distintas capas que se definen en el cartílago articular. Imagen obtenida de la página web: <http://ajs.sagepub.com>. B. Imagen representativa de un corte histológico de cartílago sano teñido con Hematoxilina-Eosina. Aumento a 100X.

1.2.3. Cambios fisiológicos en la articulación asociados con la edad

Del mismo modo que durante el proceso de maduración del cartílago se producen cambios en la estructura y composición del mismo, también aparecen a lo largo de la vida transformaciones relacionadas con la edad. Durante el envejecimiento, el equilibrio entre la síntesis y degradación de los componentes de la matriz del cartílago se ve alterado y el índice de pérdida de nuevas moléculas sintetizadas supera al índice de depósito. Ello origina cambios que incluyen una ligera fibrilación en el cartílago, además de un debilitamiento de la superficie articular, resultante de una disminución en el tamaño de los agregados, produciéndose de esta manera una pérdida de la capacidad de agregación de los proteoglicanos. La concentración de los GAGs, especialmente del condroitín sulfato, desciende. También disminuye la cantidad de agua y aumenta el diámetro y entramado fibrilar de las fibras de colágeno, por lo que en general hay una mayor rigidez en la matriz y pérdida global en la resistencia de esta a las fuerzas de tracción asociadas al funcionamiento normal de la articulación. Todos estos cambios pueden ser consecuencia del cambio en el fenotipo del condrocito, cuya capacidad sintetizadora decrece así como su número con la edad, reduciéndose en consecuencia su habilidad de mantener la homeostasis del cartílago. El resultado de estos cambios dará lugar a un posible escenario para el establecimiento de enfermedades degenerativas asociadas al cartílago, como es la artrosis (Horton et al., 2006). En este sentido, Shane Anderson y Loeser (2010) describieron una serie de cambios en el cartílago envejecido que pueden estar contribuyendo a la artrosis (**tabla 1**).

Tabla 1: Cambios en el cartílago durante el envejecimiento que contribuyen al desarrollo de la artrosis	
Cambios con la edad	Contribución a la artrosis
Aumento del número de células senescentes exhibiendo un fenotipo secretor.	Incremento de la producción de citoquinas y metaloproteasas que estimulan la degradación de la matriz.
Estrés y daño oxidativo.	Incremento de la susceptibilidad a la muerte celular y consiguiente síntesis de la matriz reducida.
Descenso en los niveles de factores de crecimiento y reducida capacidad de respuesta a los mismos.	Reducción en la síntesis y reparación de la matriz.
Incremento de la formación de AGEs (productos finales de glicosilaciones no enzimáticas).	Formación de un tejido quebradizo con incremento del desgaste por fatiga.
Descenso en el tamaño del agregado y de la hidratación del cartílago. Incremento de la ruptura de las fibras de colágeno.	Reducida resistencia a las fuerzas de tracción y elasticidad.
Incremento de la calcificación de la matriz.	Propiedades mecánicas alteradas y una activación potencial de la señalización inflamatoria.

Tabla 1: Cambios en el cartílago durante el envejecimiento que contribuyen al desarrollo de la artrosis. En la tabla se describen aquellas alteraciones que aparecen en el cartílago con la edad y que pueden derivar en procesos patológicos observados en la artrosis.

1.2.3.a. La inflamación en el envejecimiento

Se ha descrito ampliamente que la edad supone un factor de riesgo en el establecimiento de ciertas enfermedades, entre las que se encuentra la propia artrosis. Aunque todavía no se conoce completamente el mecanismo por el cual el tejido envejecido se vuelve más vulnerable a la enfermedad, tradicionalmente se ha planteado que el efecto combinado de la acumulación de daño oxidativo junto un debilitamiento en el sistema de defensa anti-oxidante puede estar colaborando en este proceso. En esta línea, se postuló recientemente la ‘hipótesis de la inflamación molecular en el envejecimiento’, que defiende que el desequilibrio en el balance oxidativo de la célula podría estar activando ciertos factores de transcripción sensibles al estado de reducción-oxidación (REDOX), que a su vez activarían la expresión de genes pro-inflamatorios (Chung et al., 2009). Por tanto, se estaría generando a nivel molecular un estado inflamatorio de bajo grado pero crónico, que podría actuar como uno de los factores desencadenantes de los procesos patológicos asociados a la edad (Chung et al., 2009). En concordancia con esta hipótesis, diferentes autores han acuñado el término ‘inflammaging’ (inflamación+envejecimiento) (Goto, 2008), un concepto que propone que el envejecimiento tanto fisiológico como patológico puede estar dirigido por moléculas pro-inflamatorias, y vendría definido por una inflamación con unas características propias (tabla 2).

Tabla 2: Características de la inflamación en el envejecimiento:
1. De bajo grado
2. Controlada
3. Asintomática y no patológica
4. Crónica
5. Sistémica
6. Con efectos beneficiosos en estados tempranos de la vida, pero que puede llegar a tener efectos perjudiciales en edades mas avanzadas.

Tabla 2: Características de la inflamación en el envejecimiento. En esta tabla se describen las peculiaridades de la inflamación que emergen en los tejidos con la edad.

1.3. El tejido sinovial

La sinovial está constituida por una membrana delgada, transparente y vascularizada, que recubre la articulación. Se compone a su vez por dos capas, la subíntima y la íntima. Esta última en un individuo sano está formada por 2 a 3 capas discontinuas de sinoviocitos, células que en base a su estructura y función se pueden clasificar en dos tipos: sinoviocitos tipo A, con un elevado potencial fagocítico y procedentes de la médula ósea, por lo que se definen como células de estirpe monocítico/macrofágico, pudiendo liberar prácticamente los mismos mediadores que los macrófagos; y sinoviocitos tipo B, de estirpe fibroblástica y procedentes del mesénquima local, que son las células mayoritarias de la capa íntima y están encargados de secretar los constituyentes de la MEC. Otras funciones identificadas para los sinoviocitos son la posibilidad de ser células presentadoras de antígenos a los linfocitos, producir citoquinas y

controlar la vascularización sinovial. Por otra parte, la capa subíntima está formada por un tejido conjuntivo con fibras elásticas, y una cantidad variable de tejido adiposo. Su componente elástico evita la formación de excesivos pliegues durante el movimiento. Además, este tejido es rico en histiocitos y posee una buena vascularización, tanto sanguínea como linfática (**figura 6**) (De Toro y Galdo-Fernández, 2002).

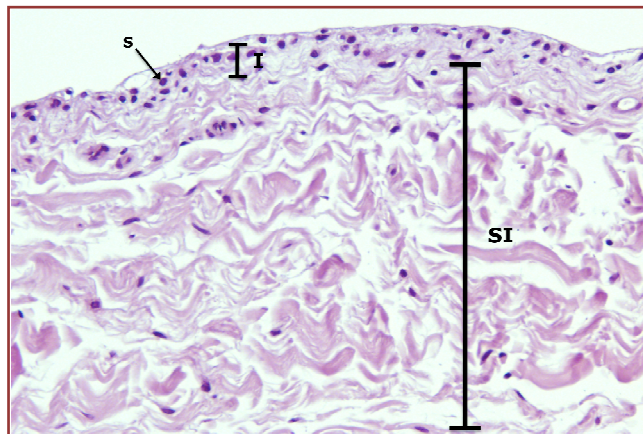


Figura 6: Imagen representativa de un tejido sinovial. Tinción histológica de un tejido sinovial sano teñido con Hematoxilina-Eosina, en la que se puede apreciar la íntima (I) formada por capa de sinoviocitos (s), y la subíntima (SI). Aumento a 200X.

La membrana sinovial contribuye en gran medida al funcionamiento fisiológico de la articulación. A través de su capa superficial de sinoviocitos metabólicamente activa, juega un papel crucial en la nutrición del condrocito, en la regulación del recambio del líquido sinovial y en la eliminación de metabolitos y productos de degradación de la matriz localizados en el espacio sinovial. De esta forma, el sinoviocito mantiene un ambiente metabólico normal dentro de la articulación (Aigner et al., 2007). Además, los sinoviocitos también liberan grandes cantidades de ácido hialurónico y otros factores como la lubricina, los cuales proporcionan a las superficies articulares su capacidad de lubricación (Schumacher et al., 1999).

2. LA ARTROSIS

La artrosis (OA) es la patología articular más frecuente en la población, afectando hasta el 10-15% de la población mundial. Su prevalencia aumenta con la edad, hasta el punto que más del 70% de los mayores de 65 años manifiestan signos radiológicos típicos de OA. Sin embargo, no se debe considerar a la patología artrósica como una consecuencia ineludible del envejecimiento articular. Otros factores como la obesidad, predisposición genética, sexo, o hábitos locomotores favorecen su desarrollo. Supone la onceava causa de consulta en atención primaria, y es además la causa más común de incapacidad en personas de edad avanzada (en España representa la primera causa de invalidez permanente). Por ello, y en relación a su coste socioeconómico, la OA representa un gasto sustancial en la salud pública mundial. Dada su

relación con la edad, estos datos se hacen especialmente preocupantes en los países del primer mundo, donde la población está especialmente envejecida y aumenta la prevalencia de la obesidad. En España, la OA afecta al 10% de la población general, representando casi la cuarta parte del total de pacientes atendidos en las consultas de reumatología (dato obtenido de www.ser.es).

La OA es una patología degenerativa de las articulaciones que se caracteriza por la degradación progresiva del cartílago articular hialino; pero también, por cambios en el resto de tejidos articulares, incluyendo entre otros, un engrosamiento del hueso subcondral y un variable grado de inflamación sinovial con formación del *pannus*, tejido sinovial que prolifera e invade al resto de tejidos articulares (**figura 7**). Todo ello deriva en dolor y pérdida gradual de la función articular (Loeser, 2010). Añadir, que una característica importante de la OA es su lenta progresión, de forma que el daño articular sólo puede detectarse después de años de evolución.

Finalmente, resaltar que durante el transcurso de la enfermedad existen periódicamente fases de empeoramiento del dolor que pueden reflejar la presencia de un proceso inflamatorio, tanto en la membrana sinovial, como en el cartílago. En este sentido, actualmente hay un consenso general señalando a este componente inflamatorio, no necesariamente como causa primaria de la patología artrósica, pero si como factor clave en su progresión (López-Armada et al., 2007; Pelletier et al., 2001), incluso algunos grupos afirman que el proceso inflamatorio está presente desde el inicio de la enfermedad.

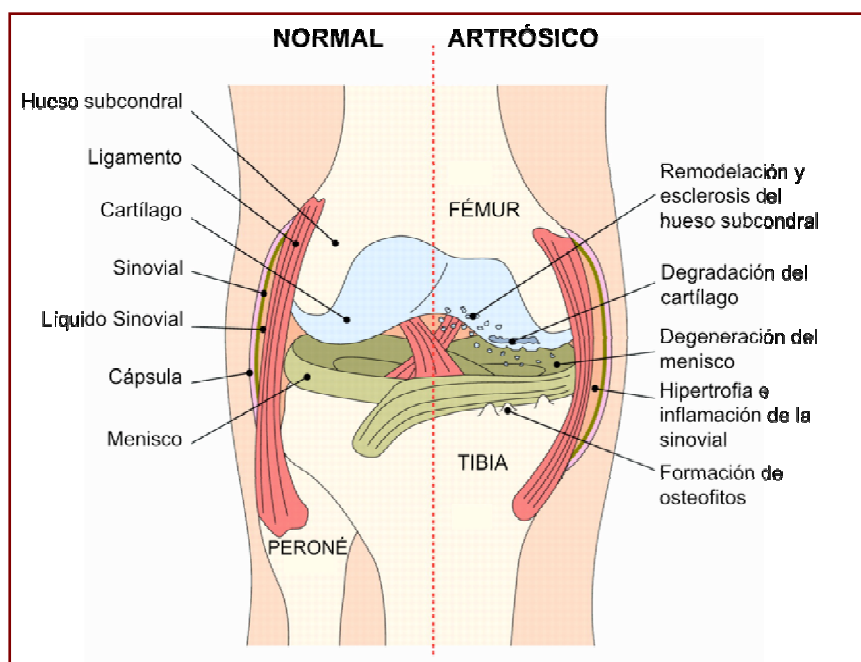


Figura 7: Patología de la artrosis. La articulación artrósica se caracteriza por la degradación y pérdida del cartílago articular, engrosamiento del hueso subcondral, y formación de osteofitos en la superficie articular. Asimismo, se puede apreciar la degeneración del menisco y un grado variable de sinovitis con una sinovial hipertrofica. Imagen obtenida de la página web: <http://www.bmj.com>

2.1. Fisiopatología de la artrosis

Para estudiar la fisiopatología de la OA es necesario analizar el cartílago articular, la membrana sinovial y el hueso subcondral, así como el resto de tejidos que rodean a la articulación; es decir, los músculos, nervios, tendones y ligamentos. Sin embargo, y como ya se ha mencionado, el episodio clave que caracteriza a la OA es la degeneración del cartílago articular, resultado de una degradación de la MEC y de una clara hipocelularidad respecto al cartílago normal. Diferentes estudios han señalado que esta reducción en el número de condrocitos se debe en parte a procesos apoptóticos (Kim y Blanco, 2007). Por ello, y a pesar de no conocer con exactitud la etiopatogenia de la OA, la teoría más extendida sitúa en el cartílago el inicio de la enfermedad, al perderse en el condrocito el equilibrio entre los procesos anabólicos (síntesis de matriz extracelular) y catabólicos (degradación de matriz extracelular) que mantiene la integridad de la MEC (Martel-Pelletier et al., 2008). El desenlace final es la destrucción de la MEC, como consecuencia de la acción de enzimas proteolíticas, fundamentalmente metaloproteasas, sintetizadas por los propios condrocitos, así como por otras células del entorno articular.

Como resultado de la degradación de la matriz del cartílago, se generan fragmentos macromoleculares que son liberados en el fluido sinovial, entre los que cabe destacar a los fragmentos de fibronectina. Estos mismos son capaces de inducir tanto en el condrocito como en la membrana sinovial la producción de citoquinas y óxido nítrico (NO) (Murphy y Lee, 2005; Yasuda, 2006), además de la síntesis de más metaloproteasas (Del Carlo et al., 2007). También, se ha descrito que el condrocito puede reaccionar a alteraciones en su matriz pericelular o a la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), las cuales han sido descritos como ligandos de receptores tipo *Toll* (TLR) y receptores de productos finales de glicosilaciones (RAGE) (Goldring y Otero, 2011). De esta manera, se establece un eje de unión entre destrucción e inflamación, donde el balance de uno puede influir en el del otro (Murphy y Lee, 2005). A su vez, la propia membrana sinovial estimulada es capaz de liberar más mediadores que retroalimentan la respuesta inflamatoria y destructiva en el cartílago. El hueso subcondral también está implicado en este proceso, respondiendo o dirigiendo la señalización en el proceso final de la degradación del cartílago. En resumen, entre los distintos tejidos que componen la articulación se produce una red de comunicaciones, generándose un ciclo persistente de inflamación-destrucción difícil de interrumpir (Abramson et al 2006; Goldring, 2000; Krasnokutsky et al., 2007) (**figura 8**). A continuación se detallan los cambios más importantes que tienen lugar en la articulación durante el proceso artrósico.

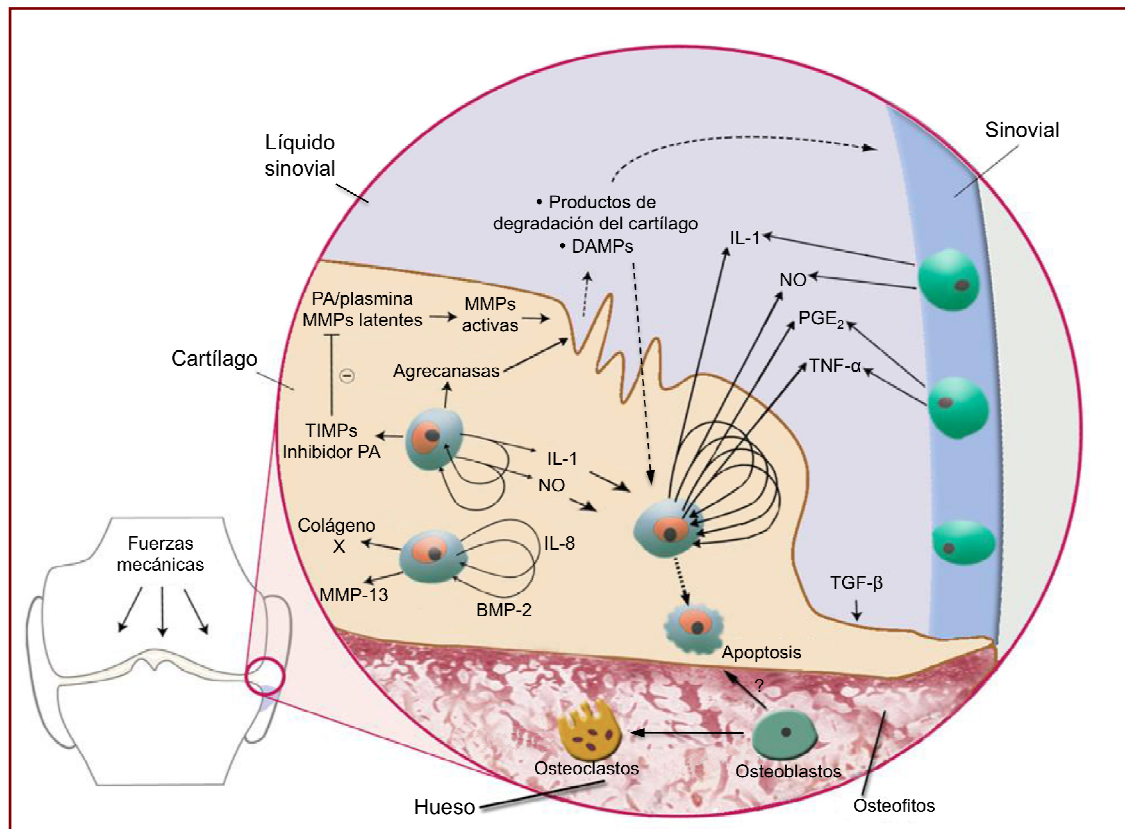


Figura 8: Representación esquemática de las interacciones entre los diferentes tejidos que componen la articulación. El estrés mecánico o factores biológicos pueden desencadenar en el condrocito el programa catabólico. Como resultado del aumento de este programa se activa la expresión de citoquinas y de enzimas degradadoras de la matriz. Los fragmentos liberados por esta degradación inducen la expresión de más mediadores inflamatorios y destructivos en el propio condrocito y en el tejido sinovial. Estos actuarán a su vez retro-alimentando el programa catabólico en la articulación, induciendo la formación de osteofitos, remodelación del hueso subcondral o la expresión de marcadores de hipertrofia en el condrocito (MMP-13, Colágeno X, IL-8). BMP: proteína morfogenética del hueso; DAMP: patrón molecular asociado a daño; IL: interleuquina; MMP: metaloproteasa de matriz; NO: óxido nítrico; PA: activador de plasminógeno; PGE₂: prostaglandina E₂; TGF-β: factor de crecimiento tumoral; TIMP: Inhibidor tisular de metaloproteasa; TNF: factor de necrosis tumoral. Imagen obtenida y modificada de Abramson et al., 2006.

2.1.1. Cambios en el cartílago articular durante el proceso artrósico

Durante los primeros estadios de la enfermedad se van a poder detectar una serie de cambios en la estructura del cartílago, que comenzarán con una casi imperceptible fibrilación en la capa superficial, que se irá extendiendo a medida que la enfermedad avanza hacia la zona media y finalmente será también visible en la capa profunda (Pritzker et al., 2006). Este proceso irá acompañado de fisuras que crecerán progresivamente. Además, también se observa una localizada calcificación de la capa superficial, un ejemplo de ello es la presencia en la superficie articular de protuberancias óseas llamadas osteofitos. Por otra parte, los condrocitos podrán sufrir tanto procesos apoptóticos (Kim y Blanco, 2007), como una reacción hipertrófica inicial en un intento de reparación de la matriz, incrementando el número y tamaño de los clústeres celulares en las zonas próximas a estas fisuras, proceso que ha sido calificado como un claro marcador histológico de OA (Lotz et al., 2010). En la fase avanzada de la enfermedad, la

pérdida de MEC se extenderá de forma que la superficie articular pasa a estar totalmente mineralizada o a dejar el hueso al descubierto; además, es posible observar la deformidad en la articulación (Pritzker et al., 2006).

Junto con estos cambios estructurales, también se producirán alteraciones a nivel bioquímico. En concreto, se produce una disminución en el contenido y composición de proteoglicanos, que precederá a la perturbación de la red de colágeno (Benito, 2002). El conjunto de estas alteraciones se traducirá finalmente en la rigidez del cartílago y en consecuencia en una pérdida de resistencia a las fuerzas de tensión (Horton et al., 2006). Un ejemplo visual de algunos de estos cambios se puede observar en la siguiente figura (**figura 9**).

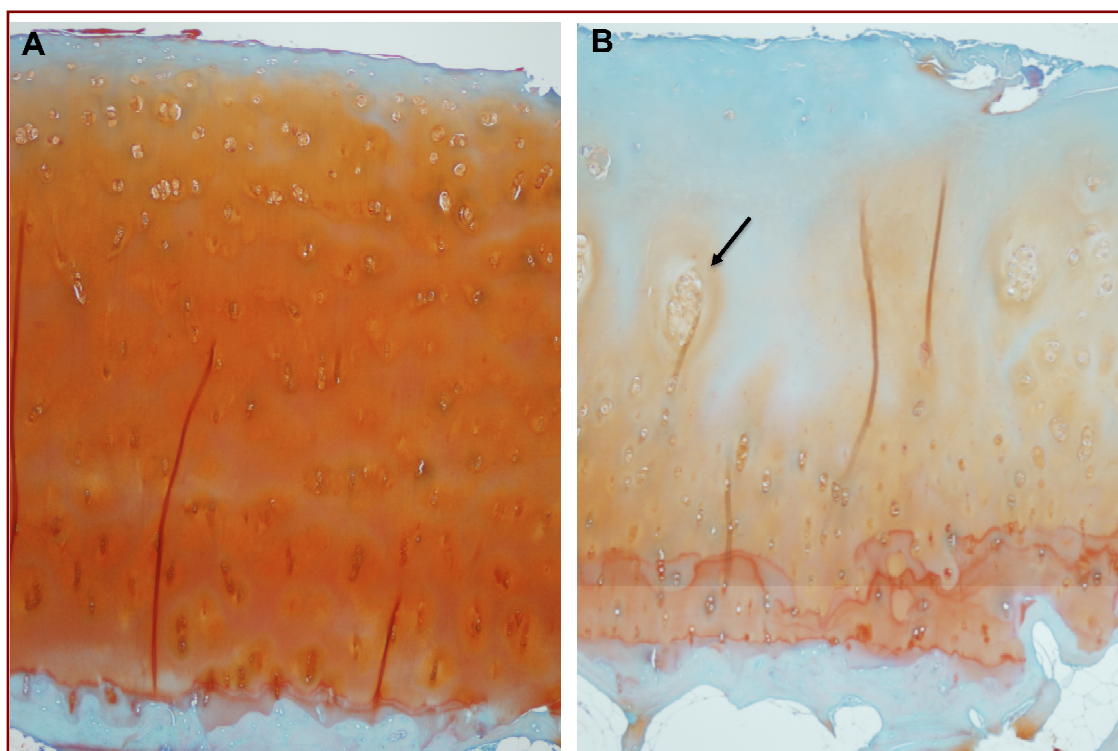


Figura 9: Morfología del cartílago articular humano normal y artrósico. Tinción histológica con Safranina O-Verde luz de cartílago procedente de rodilla sana (sin patología articular diagnosticada) (A) y artrósica (B). En la figura se puede observar una pérdida de la tinción en el corte de la rodilla artrósica, lo que indica una disminución en el contenido de proteoglicanos. Además, es apreciable la erosión y fibrilación de su superficie articular, junto con un cambio en la distribución de los condrocitos (se agrupan en clústeres patológicos en la capa superficial-media del cartílago, señalado con una flecha). Aumento a 40X.

2.1.2. El tejido sinovial en la artrosis

Aunque clásicamente se ha señalado a la sinovial como un tejido no activo o de escasa importancia en la fisiopatología artrósica, diferentes estudios han observado un proceso de sinovitis asociada a la evolución del daño en el cartílago (Sokolove y Leptus, 2013). De hecho, es en la membrana sinovial y en concreto, en el proceso inflamatorio que en ella se desarrolla, donde la comunidad científica está desarrollando importantes esfuerzos para ayudar a desentrañar el origen y progresión de la OA. Así, se ha descrito como en estadios tempranos de

la enfermedad este tejido libera de forma activa mediadores destructivos e inflamatorios (Young et al., 2001). En esta misma línea, en un estudio comparativo entre pacientes con un grado inicial y severo de patología artrósica, se observó la presencia de un mayor infiltrado de células mononucleares y expresión de mediadores inflamatorios en aquellas sinoviales en las primeras fases de la enfermedad (Benito et al., 2005). Como consecuencia de la secreción de estos mediadores al líquido sinovial, el condrocito puede sufrir un cambio en su metabolismo (Attur et al., 2002), que finalmente deriva en un proceso de degeneración progresiva del cartílago articular adyacente. De esta forma, estos hallazgos sugieren claramente la importancia de la sinovitis en la fisiopatología artrósica.

La etiología de la sinovitis durante la OA no está todavía clara, aunque en general se cree que se deriva de una reacción secundaria a la liberación de productos de degradación del cartílago en el líquido sinovial (Attur et al., 2002). Sin embargo, se han descrito otros posibles orígenes a esta reacción, como puede ser una respuesta en el sinoviocito a un estrés mecánico (Abramson, 2004).

El tejido sinovial está formado habitualmente por 2 o 3 capas discontinuas de sinoviocitos y una escasa presencia de células inflamatorias. Durante los procesos inflamatorios artrósicos crónicos, lo más habituales y de larga duración, se observa una marcada hiperplasia de los sinoviocitos que forman la íntima, un incremento en la angiogénesis, y una alta infiltración de células inflamatorias, constituida básicamente por macrófagos y un pequeño número de células B, T y mastocitos (Sokolove y Leptus, 2013). Sin embargo, también se puede detectar casos eventuales de sinovitis agudas, que se caracterizan por un infiltrado mayoritariamente de neutrófilos (Benito et al., 2005; Bonnet y Walsh 2005) (**figura 10**).

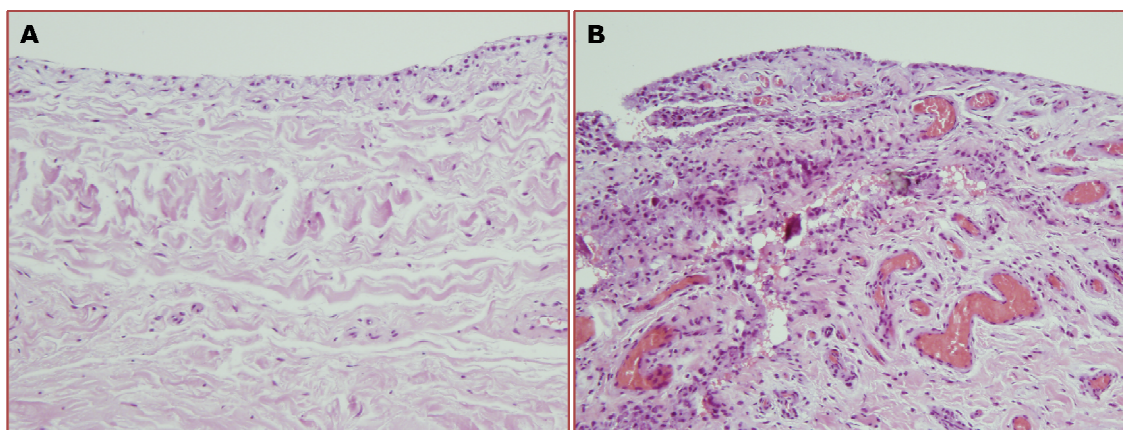


Figura 10: *Tejido sinovial humano normal y artrósico.* Tinción histológica de un tejido sinovial sano (A) y artrósico (B) teñido con Hematoxilina-Eosina (aumento a 100X). En la condición artrósica se puede apreciar una clara hiperplasia e hipertrofia del tejido sinovial, además de un gran aumento de su vascularización.

Finalmente, destacar que los cambios patológicos que se observan en el tejido sinovial de un paciente con una grado severo de OA son muy similares a los detectados en pacientes con una patología articular clásicamente inflamatoria, como es la artritis reumatoide (AR) (López-

Armada et al., 2007). Además, son muchos los hallazgos señalando que las diferencias con respecto a la producción de citoquinas entre los tejidos OA y AR son solamente cuantitativas más que cualitativas (Furuzawa-Carballeda et al., 2008).

2.2. Mecanismos de destrucción

La OA se caracteriza por la degradación del cartílago articular. Entre los mecanismos que están implicados en la destrucción del cartílago destacan los factores mecánicos y los mediadores biológicos. Así, el cartílago articular está expuesto a un continuo estrés mecánico. Este estrés mecánico en rango fisiológico induce la actividad anabólica, produciéndose la renovación de la matriz; mientras que un nivel bajo de estrés mecánico sobre el cartílago o a un rango superior al fisiológico aumenta la actividad catabólica, generándose una pérdida progresiva de las macromoléculas de la matriz. La forma en que el factor mecánico regula la actividad metabólica del condrocito no es del todo conocida, pero se ha descrito que en ella pueden estar implicados mecanorreceptores, ser inducida tras estimular la liberación de citoquinas, o bien, por favorecer un mejor aporte de las sustancias nutritivas en el cartílago (Lane Smith et al., 2000; Ramage et al., 2009; Trujillo-Martín y Monfort-Faure, 2002).

La degradación progresiva de la matriz extracelular de los tejidos que constituyen la articulación, incluyendo el cartílago articular, tejido sinovial y hueso subcondral es un suceso habitual en la mayor parte de las enfermedades articulares. Este proceso de degeneración está dirigido fundamentalmente por una serie de enzimas denominadas metaloproteasas. Estas enzimas son endopeptidasas capaces de cortar determinadas proteínas en el interior de la cadena peptídica. Este grupo de proteasas se divide a su vez en cinco familias, entre las que destacan dos de ellas: las metaloproteasas de matriz (MMPs) o matrixinas, y las adamalisin (Rengel et al., 2007), por ser sus dianas las moléculas de la matriz más afectadas en el proceso artrósico (colágeno y agregano respectivamente). Es por ello, que estas han recibido un mayor grado de atención en su identificación.

2.2.1. Metaloproteasas de matriz (MMPs) o matrixinas

Son una familia de enzimas dependientes de zinc y calcio encargadas de la renovación de las proteínas de la matriz extracelular. Estas proteasas pueden ser sintetizadas tanto por las células residentes en los tejidos de la articulación como por las células invasoras. Participan en la remodelación de la MEC tanto en procesos fisiológicos (angiogénesis, embriogénesis) como en procesos patológicos. En este sentido, su sobreexpresión está asociada a patologías articulares como la OA y la AR (Yasuda, 2006). Estas enzimas se van a dividir a su vez en cinco grandes familias de acuerdo con la especificidad del sustrato y su estructura primaria:

- *Colagenasas* (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), son muy importantes tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, ya que entre otros tienen como

sustrato al colágeno tipo II, el componente más abundante de la MEC del cartílago. Tanto MMP-1 como MMP-8 y MMP-13 se encuentran incrementadas en el cartílago artrósico (Close, 2001; Rengel et al., 2007; Yasuda, 2006). De hecho, existe una relación directa entre dichos niveles y el grado de severidad en la OA. En este sentido, se han descrito resultados prometedores de la neutralización de la actividad de MMP-13 para su uso terapéutico (Li et al., 2011).

- **Gelatinasas** (MMP-2, MMP-9), degradan específicamente colágenos membranosos no fibrilares. En el cartílago artrósico se han encontrado niveles de la gelatinasa tipo B (MMP-9) en concentraciones más altas que en el cartílago sano (Close, 2001; Rengel et al., 2007).

- **Estromelisin** (MMP-3, MMP-10, MMP-11), sus sustratos naturales son principalmente proteoglicanos y fibronectina. La MMP-3 se ha asociado fundamentalmente a AR, aunque también puede encontrarse en sueros de pacientes con OA (Close, 2001; Rengel et al., 2007). Además, esta última se caracteriza por activar a otras pro-colagenasas.

- **Matrilisin** (MMP-7, MMP-26), degradan agrecanos, gelatina y fibronectina. La MMP-7 ha sido asociada al cartílago artrósico (Close, 2001).

- **De membrana** (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25), han sido recientemente identificadas y son capaces de digerir colágenos fibrilares, preferentemente del tipo I, además de gelatinas, proteoglicanos y fibronectina (Mort y Billington, 2001).

2.2.2. Adamalisin: Agrecanasas

Las adamalisin con motivo trombospondina (ADAMTS) contienen a las principales agrecanasas responsables de la degradación del agrecano durante las primeras fases de la remodelación del cartílago. Concretamente rompen el enlace entre los dominios G1 y G2 del agrecano. ADAMTS-1, ADAMTS-4 y ADAMTS-5 son las más importantes y mejor descritas en el tejido articular, siendo esta última la más predominante en el proceso artrósico (Glasson et al., 2005; Nagase y Kashiwagi, 2002; Rengel et al., 2007). Al igual que ocurría con las MMPs, tanto condrocitos como sinoviocitos son capaces de sintetizarlas (Mort y Billington, 2001; Nagase y Kashiwagi, 2002; Rengel et al., 2007).

En general todas estas proteasas tienen unos niveles de expresión bajos, y son sintetizadas y liberadas solamente bajo una señal específica, como las citoquinas. Además, las MMPs son sintetizadas en forma inactiva (pro-enzima) y necesitan ser escindidas para poder ejercer su acción. La actividad enzimática de estas enzimas está controlada mediante la acción de unos inhibidores selectivos, entre los que destacan los inhibidores tisulares de

metaloproteasas (TIMPs). Así, en el cartílago artrósico existe un desequilibrio entre la cantidad de TIMPs y de metaloproteasas. En el cartílago adulto se han identificado TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3. En concreto, este último es capaz de inhibir ADAMTS-4, ADAMTS-5 y diferentes MMPs (Mort y Billington, 2001; Rengel et al., 2007).

En contraposición, añadir que las metaloproteasas, a parte de su función destructiva, también pueden liberar factores de crecimiento de la matriz extracelular, y actuar como reguladores de respuestas pro- o anti-inflamatorias (Murphy y Lee, 2005).

Además de las metaloproteasas, otros mediadores bioquímicos intervienen en la degradación de la matriz, entre ellos podemos señalar las especies reactivas de oxígeno (ROS) o el NO. Este radical libre inhibe la proliferación y la síntesis de matriz nueva, e induce la muerte del condrocito, limitando así la capacidad de reparación de la matriz del cartílago. Además, puede provocar una degradación tanto directa como indirecta del cartílago. Otras moléculas que inhiben la proliferación de los condrocitos y la síntesis de proteoglicanos, son las prostaglandinas (PGs), concretamente la PGE₂. Finalmente mencionar a las citoquinas, de las cuales algunas han sido descritas como inductoras de procesos anabólicos, mientras que otras como las interleuquinas (IL-1, IL-6 e IL-8) o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) intervienen principalmente en las respuestas catabólicas del cartílago y por tanto destructivas (Goldring, 2000; López-Armada et al., 2007; Martel-Pelletier et al 2008). A continuación se describen con mayor detalle cada uno de estos mediadores.

2.3. La inflamación en la artrosis

Clásicamente la OA no se ha considerado una patología inflamatoria debido a la escasez de neutrófilos en el líquido sinovial y a la inexistencia de manifestaciones sistémicas de inflamación. Sólo en cierto casos, y en estadíos tardíos de la enfermedad, se aceptaba la presencia de inflamación en la articulación artrósica (Blanco, 1999). Sin embargo, diversos signos y síntomas observados en la OA, tales como calor, tumefacción, derrame o rigidez, reflejan claramente una inflamación del tejido sinovial. Fue George E. Ehrlich en 1975 el primero en enfatizar la importancia de la inflamación en la OA (Ehrlich, 1975). A partir de entonces, un creciente número de autores han descrito el papel clave que diferentes mediadores pro-inflamatorios están desempeñando en las distintas fases de la patología artrósica. Además, tanto el condrocito como el sinoviocito presentan la capacidad de producir una gran variedad de estos mediadores, siendo los más importantes las citoquinas, entre las que destacan el TNF- α , la IL-1 β o la IL-8; así como, los ROS, el NO y otros mediadores lipídicos como la PGE₂.

2.3.1. Citoquinas en la artrosis

Las citoquinas son un grupo de mediadores solubles formados por proteínas de bajo peso molecular cuya función fundamental es la comunicación intercelular. Fueron descubiertas inicialmente como mediadores de señales en el sistema inmunológico, pero hoy en día se sabe que muchos otros tipos celulares, como los condrocitos y los sinoviocitos, tienen la capacidad de sintetizar, liberar y responder a las citoquinas. En el tejido articular, las citoquinas se han clasificado según su función en catabólicas, anabólicas y moduladoras. Estas últimas se encargan de modular la liberación y actividad de las citoquinas catabólicas y anabólicas, cuyo balance determinará la integridad del tejido articular (Blanco, 1999; Goldring, 2000; López-Armada et al., 2007; Martel-Pelletier et al., 2008) (**Figura 11**).

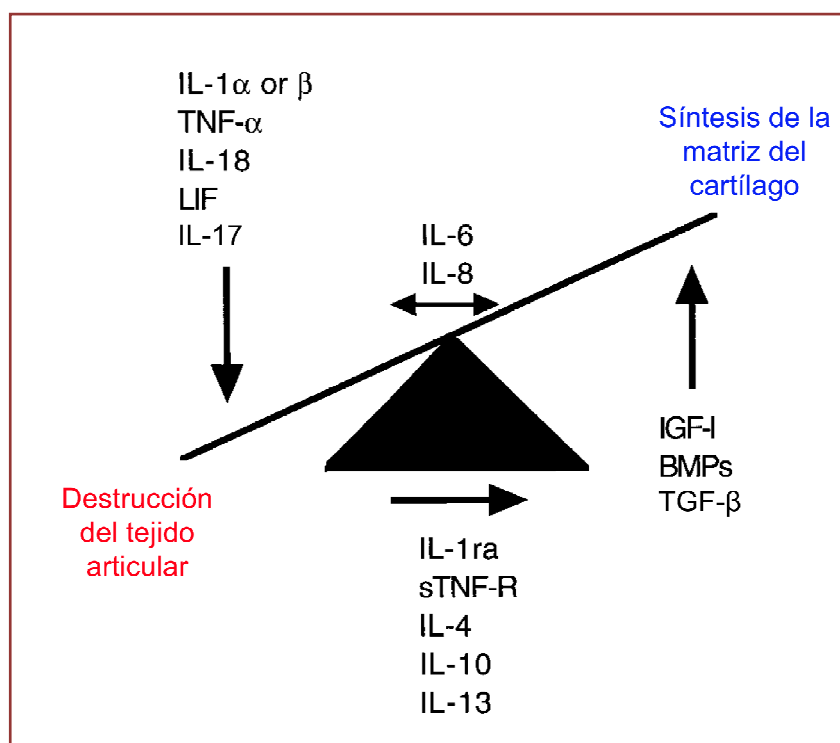


Figura 11: Balance de citoquinas en la artrosis. En el tejido articular podemos encontrar tanto citoquinas catabólicas, como inhibidoras de la actividad destructiva de estas. Además, también estarán presentes citoquinas anabólicas que estimulan la producción de componentes de la matriz. El equilibrio entre todas ellas determinará el grado de severidad del daño articular. IL-1: interleuquina-1; TNF: factor de necrosis tumoral; LIF: factor inhibidor de leucemia; IL-1ra: receptor antagonista de interleuquina-1; sTNF-R: receptor soluble del factor de necrosis tumoral; IGF-1: factor de crecimiento tipo insulina 1; BMPs: proteínas morfogenéticas del hueso; TGF-β: factor transformador del crecimiento β. Imagen extraída de Goldring, 2000.

No hay duda de que los procesos de degradación e inflamación del tejido articular están íntimamente ligados a las citoquinas catabólicas o pro-inflamatorias (Berenbaum et al., 2013; Martel-Pelletier y Pelletier, 2007). Entre ellas cabe destacar a la IL-1β y el TNF-α, que a su vez son capaces de inducir la expresión de otras citoquinas como IL-8 o IL-6, u otros mediadores

inflamatorios como PGE_2 o NO (Fernandes et al., 2002; Kapoor et al., 2011). Además, la IL-1 β y el TNF- α participan directamente en la activación de las enzimas degradadoras de la MEC en la OA. Estas citoquinas se pueden generar desde y hacia la membrana sinovial, cartílago articular y hueso subcondral. Asimismo, estas citoquinas pueden participar en procesos de remodelación ósea que pueden derivar en la formación de osteofitos.

2.3.1.a. La interleuquina 1 β

Como resultado de sus múltiples efectos catabólicos, la IL-1 β es, junto con el TNF- α , la citoquina más importante en la patología artrósica (Goldring et al, 2011; Mueller y Tuan, 2011). Esta molécula es sintetizada como un precursor cuya activación depende de una proteasa denominada enzima de conversión de IL-1 β (ICE), cuyos valores están aumentados en los tejidos artrósicos (Saha et al., 1999). La IL-1 β es capaz de estimular su propia producción y como ya se ha mencionado la de otros mediadores inflamatorios (IL-8, IL-6), incrementar la síntesis de enzimas catabólicas como MMPs (Tetlow et al., 2001), inhibir la síntesis de los inhibidores de estas mismas (TIMPs) (Martel-Pelletier et al., 2008), e impedir la síntesis de componentes de la MEC como proteoglicanos y colágeno II, aumentando en contraposición la concentración de colágeno tipo I y III (Benton y Tyler., 1988, Goldring et al., 1988). Además, es un potente inhibidor de la proliferación inducida por el factor transformador del crecimiento β (TGF β) en el condrocito (Román-Blas et al., 2007). Se ha descrito que también estimula la síntesis de las isoformas inducibles de las enzimas sintetasa del NO y de la ciclooxigenasa, aumentando así la síntesis y liberación de NO y PGs catabólicas, respectivamente (Geng et al., 1995; Palmer et al., 1993; Stadler et al., 1991). Otros estudios también desarrollados en sinoviocitos y condrocitos, implican a esta citoquina con un incremento en la población de células apoptóticas, posiblemente a través de una mayor producción de NO y otras especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Abramson, 2008; Cillero-Pastor et al., 2011). En resumen, la acción de esta citoquina en el tejido articular tiene como resultado el fenotipo destructivo característico de la OA, con destrucción del cartílago, inflamación sinovial y reabsorción ósea.

La IL-1 β ejerce sus acciones biológicas a través de su unión a receptores específicos de la superficie celular denominados IL-1R tipo I y tipo II. El primero de ellos está incrementado en condrocitos y sinoviocitos de pacientes con OA, lo cual hace a las células del tejido artrósico más sensibles a esta citoquina. Un antagonista natural de la IL-1 β es el denominado antagonista del receptor de la IL-1 β (IL-1Ra), que neutraliza la acción de esta citoquina al competir con ella por unirse a sus receptores, pero no ser capaz de desencadenar la cascada de señalización en la célula diana. En particular, en un ensayo en pacientes con OA la inyección intraarticular de un inductor de la síntesis de IL-1Ra mejoró significativamente la función articular y los síntomas de la enfermedad (Yang et al., 2008).

Sin embargo, IL-1 β también estimula la renovación de la MEC, desempeñando así un papel fisiológico importante en el cartílago. Para ello, es necesario que existan diferentes sistemas para controlar la excesiva activación de la citoquina. Uno de ellos es el mencionado, IL-1Ra. Sin embargo, el NO, un mediador inducido por IL-1 β , puede inhibir la expresión de este antagonista, favoreciendo así el aumento de los efectos catabólicos de la citoquina (Pelletier et al., 1996).

2.3.1.b. *El factor de necrosis tumoral α*

El TNF- α es otra citoquina fundamental en la destrucción de la MEC y en la estimulación de la inflamación en el tejido sinovial (Goldring et al., 2011; Mueller y Tuan, 2011). En la OA, el TNF- α también está presente, aunque fundamentalmente en un estado más avanzado de la enfermedad, por lo que las terapias biológicas destinadas a bloquear esta citoquina están empezando a ser planteadas (Malemud, 2010). Al igual que la IL-1 β , el TNF- α se sintetiza como un precursor inactivo cuya activación se realiza a través de la denominada enzima de conversión del TNF- α (TACE), cuyos niveles están elevados en el cartílago humano artrósico (Amin, 1999). Existen dos receptores de membrana diferentes para el TNF- α , uno de 55 y otro de 75 kDa (TNFR55 y TNFR75), siendo aparentemente el primero de ellos el principal responsable de la actividad del TNF- α en los condrocitos y sinoviocitos artrósicos (Alaaddine et al., 1997). Asimismo, existen receptores solubles de esta citoquina en el líquido sinovial de pacientes con OA (Cope et al., 1992), cuyo significado biológico depende de su concentración: a bajas concentraciones estabilizan a la molécula y por tanto aumentan su vida media (Aderka et al., 1992); mientras que a altas concentraciones pueden reducir la actividad de TNF- α al entrar en competición con los receptores de membrana (López-Armada et al., 2007; Higuchi y Aggarwal, 1992).

En relación a su actividad biológica, el TNF- α estimula la síntesis de las colagenasas y estromelisin, inhibe la producción de proteoglicanos y colágeno tipo II; e incrementa la de tipo I y III (Lefebvre et al., 1990; Malfait et al., 1994). Al igual que la IL-1 β , incrementa la liberación de PGs, NO (Geng et al., 1995; Rediske et al., 1994), y otras citoquinas (IL-8, MCP-1, IL-6) (Guerne et al., 1990; Pulsatelli et al., 1999) contribuyendo a la exacerbación de la respuesta inflamatoria.

En resumen, IL-1 β y TNF- α comparten la capacidad de activar un amplio número de vías de señalización intracelular. De hecho, ambas moléculas tienen un fuerte sinergismo. En la articulación, las vías mediadas por las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) como la quinasa c-jun N-terminal (JNK) o la activada por mitógeno p38, la proteína activadora 1 (AP-1), o el factor nuclear- κ B (NF- κ B) predominan en la regulación de los efectos catabólicos de estas dos citoquinas (Mengshol et al., 2000; Mueller y Tuan, 2011). Con respecto a NF- κ B, se ha

demostrado en los condrocitos artrósicos que ambas citoquinas comparten vías de activación pro-inflamatorias comunes, pudiendo ser la quinasa proteica C (PKC) necesaria para esta activación. Sin embargo, no todos los efectos de estas citoquinas son compartidas, así en nuestro grupo se ha descrito como el TNF- α y la IL-1 β regulan de forma diferente el proceso apoptótico en un modelo de apoptosis *in vitro* tanto en el condrocito como en el sinoviocito artrósico, detectándose un incremento de la muerte celular con el TNF- α (Caramés et al., 2008; López-Armada et al., 2006a). Asimismo, mediante análisis proteómico se demostró que ambas citoquinas inducen un perfil proteico diferente en condrocitos humanos normales en cultivo. Así, el TNF- α inhibe proteínas que promueven la actividad celular en comparación a la IL-1 β , dando lugar a las condiciones idóneas para que se inicie un proceso de muerte celular programada ante un estímulo exógeno (Cillero-Pastor et al., 2010).

2.3.1.c. La interleuquina 8

Las quimioquinas son una familia de pequeñas citoquinas pro-inflamatorias de bajo peso molecular, originalmente identificadas por su actividad quimioatrayente a través de su unión a receptores transmembrana acoplados a proteínas G. Sin embargo, hoy en día se sabe que también desempeñan un papel fundamental en otros procesos fisiológicos como el crecimiento tumoral, la angiogénesis, la fibrosis y la autoinmunidad (Cartier et al., 2005; Vergunst et al., 2005). Estas citoquinas han sido tradicionalmente clasificadas en cuatro familias basándose en la localización de sus residuos de cisteína: C, CC, CXC y CX₃C (**figura 12**).

La IL-8 es una quimioquina del tipo CXC, cuyos dos residuos cisteína N-terminal se encuentran separados por un aminoácido, e inicialmente se caracterizó como quimioatrayente de neutrófilos. Su expresión está regulada a tres niveles diferentes: (1) derrepresión del promotor del gen que lo codifica, (2) activación transcripcional mediante el factor nuclear NF- κ B y vías de señalización mediadas por JNK, y (3) estabilización del ARN mensajero (ARNm) mediante vías de señalización mediadas por la quinasa p38 (Hoffmann et al., 2002). Por otra parte, se ha descrito que la catepsina L participa en el procesamiento de IL-8, rindiendo la forma madura de 72 aminoácidos a partir de la

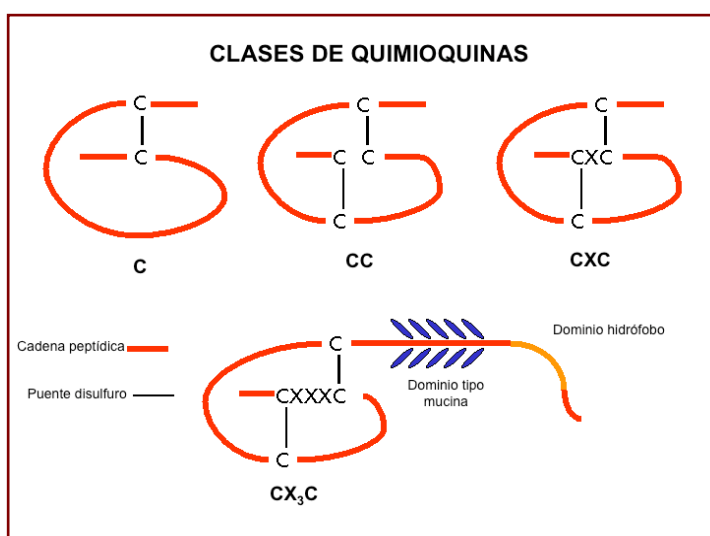


Figura 12: Estructura de las quimioquinas. La figura muestra las cuatro familias de quimioquinas en función de la localización de sus residuos de cisteína. La quimioquina IL-8 pertenece a la familia CXC. Imagen obtenida de Kohidai et al., 2007.

precursora de 77 (Ohashi et al., 2003). La sobreexpresión de esta quimioquina es inducida comúnmente por mediadores pro-inflamatorios como los ya mencionados IL-1 β y TNF- α (Lotz et al., 1992; Pulsatelli et al., 1999; Sandell et al., 2008), productos bacterianos o virales y por el estrés celular (Hoffman et al., 2002; Lee et al., 2008; Lotz et al., 1992). Esta sobreexpresión juega un papel significativo en diferentes patologías como el Alzheimer (Cartier et al., 2005), el cáncer (Waugh y Wilson, 2008), la periodontitis (Lee et al., 2008), y enfermedades articulares como la AR y OA.

En relación a la patología artrósica, se ha descrito que los niveles de IL-8, así como la de sus receptores están incrementados en el cartílago y líquido sinovial artrósico respecto a los niveles observados en la articulación sana (Attur, 2002; Kappor et al., 2011, Schlaak et al., 1996), lo cual podría contribuir en muchos de los eventos patológicos observados en la OA (Borzi et al., 2004). Así, las quimioquinas participan en la liberación de enzimas encargadas de degradar la matriz como MMP -1, -3 y -13, inhiben la síntesis de proteoglicanos (Borzi et al., 2000; Yuan et al., 2001), y aumentan la proliferación celular y la activación de vías apoptóticas (Vergunst et al., 2005). En esta línea, Facchini et al. (2005) afirmó específicamente que la IL-8 sintetizada por el condrocito podría actuar como un mediador importante en la inflamación y destrucción articular al intermediar en alguno de los efectos catabólicos inducidos por TNF- α . Otros autores han demostrado que esta quimioquina promueve la calcificación y estimula la maduración de condrocitos en estado latente hacia un estado de diferenciación hipertrófica *in vitro* (Cecil et al., 2005; Merz et al., 2003). Por tanto, el conjunto de estos hallazgos sugiere claramente que el sistema quimioquina/receptor de quimioquina está desempeñando un papel crítico en la patología artrósica (Vergunst et al., 2005; Yuan et al., 2001).

2.3.2. Eicosanoides y óxido nítrico

Además de las citoquinas pro-inflamatorias, otros mediadores biológicos desempeñan también un papel fundamental en el proceso inflamatorio artrósico, entre ellos, los más importantes son los eicosanoides (PGs y leucotrienos) y el NO (Martel-Pelletier et al., 2008).

2.3.2.a. Eicosanoides: Prostaglandinas

Las PGs, junto con los leucotrienos, pertenecen a otro gran grupo de mediadores inflamatorios involucrados en la patología artrósica. La PG más abundante en el cuerpo humano es la PGE₂, y dependiendo del contexto en el que se encuentre, puede ejercer efectos homeostáticos o inflamatorios (Hedbom et al., 2002). En relación con la patología artrósica, las PGs intervienen tanto en los fenómenos inflamatorios, como en los degenerativos. Los signos clásicos de la inflamación aguda (dolor, eritema, edema y calor) pueden ser reproducidos por las acciones de las PGs al incrementar la permeabilidad vascular y contribuir a la sensibilización al dolor (López-Armada et al., 2007). Asimismo, la PGE₂ desempeña un papel crucial en la destrucción del cartílago y del hueso yuxtaarticular (Moreno-Rubio et al., 2010), al estimular la

producción de mediadores de la degradación tisular, las MMPs, e inhibir la síntesis de proteoglicanos (Attur et al., 2008; Yamada et al., 1996). Además, la PGE_2 estimula la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) contribuyendo a los fenómenos de angiogénesis (Ben-Av et al., 1995). Por último, también es capaz de inducir la apoptosis en el condrocito (Dave et al., 2008).

Las PGs son sintetizadas a partir del ácido araquidónico por la acción enzimática de las ciclooxigenasas (COX) (**figura 13**). Se conocen dos isoformas principales: la isoforma constitutiva COX-1 (responsable de las funciones fisiológicas) y la isoforma inducible COX-2 (participa en inflamación). Como ya se mencionó anteriormente, las citoquinas pro-inflamatorias, $\text{IL-1}\beta$ y $\text{TNF-}\alpha$, son estímulos capaces de inducir la expresión de COX-2 y la síntesis de PGE_2 en condrocitos articulares humanos (Geng et al., 1995), y en sinoviocitos (Choi

et al., 2010), aunque en mayor medida mediante $\text{IL-1}\beta$. En este sentido, se ha descrito que $\text{IL-1}\beta$ pero no $\text{TNF-}\alpha$ aumentan la expresión de EP1 y EP4, receptores de PGE_2 , en condrocitos (Álvarez-Soria et al., 2007). La expresión de la forma inducible de la COX-2 está incrementada en explantes de cartílago de pacientes con OA, por lo que espontáneamente liberan PGE_2 (Amin et al., 1997; Attur et al., 2002). En contraposición, los condrocitos procedentes de donantes sin patología articular expresan únicamente la isoforma constitutiva COX-1 (Attur et al., 2002). En el caso de la sinovial, se ha observado una alta expresión de COX-2 ya en los primeros estadios de la enfermedad (Benito et al., 2005). Por otra parte, la isoforma microsomal de la enzima sintasa de prostaglandina E (PGES-1) que cataliza la conversión de PGH_2 a PGE_2 , está

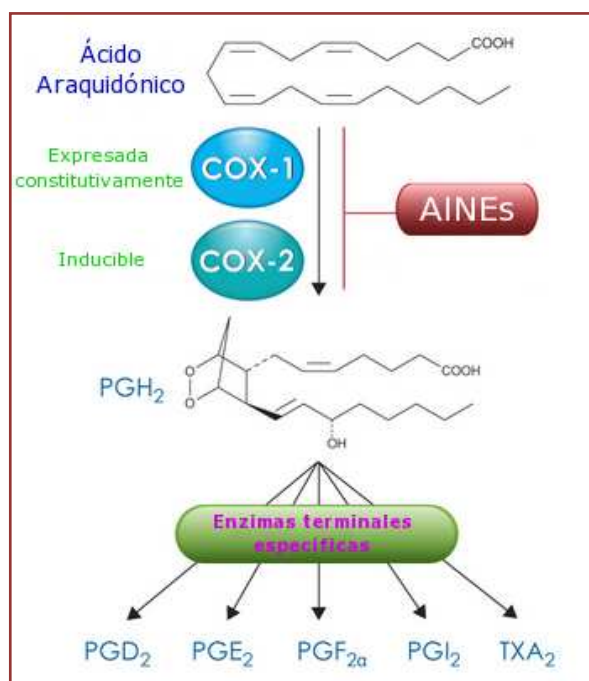


Figura 13: Ruta de síntesis de las Prostaglandinas. Las isoformas constitutiva (COX-1) e inducible (COX-2) de la ciclooxigenasa convierten el ácido araquidónico en el intermediario PGH_2 , que luego es metabolizado por las enzimas terminales específicas para sintetizar las diferentes PGs. Drogas anti-inflamatorias no esteroideas (AINEs) inhiben ambas isoformas de la COX. Imagen obtenida de la página web: <https://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2175>.

incrementada en el cartílago artrósico (Li et al., 2005). Además, la síntesis de esta enzima se encuentra regulada por estímulos pro-inflamatorios (Gabay et al., 2007) en el cartílago, condrocitos y sinoviocitos (Álvarez-Soria et al., 2008; Sitchtenoth et al., 2001).

Además de incrementar la inflamación en la articulación (Quinn et al., 1990), PGE_2 puede potenciar también los efectos de otros mediadores inflamatorios (Attur et al., 2008;

Tetlow y Woolley, 2006). Aunque el empleo de drogas anti-inflamatorias no esteroideas (AINEs), inhibiendo la síntesis de PGE_2 , supone una estrategia anti-inflamatoria habitual desde el último siglo, recientemente se ha advertido la posibilidad de que el uso en ciertos casos de los AINEs tenga efectos deletéreos en las enfermedades articulares y en el metabolismo del cartílago (Abramson, 2004; Largo et al., 2004; López-Armada et al., 2002). En este sentido, no se conoce con exactitud la función desarrollada por las PGs en la homeostasis del cartílago y se han señalado tanto efectos catabólicos como anabólicos.

2.3.2.b. *El óxido nítrico*

El NO es un radical libre que actúa como mediador en procesos tanto fisiológicos como patológicos en el organismo humano. Esta molécula es sintetizada a partir de la oxidación del aminoácido L-arginina por la familia de las sintetasas de NO (NOS). Esta familia de enzimas se clasifica en función de su forma de expresión en constitutivas (cNOS) e inducibles (iNOS). El NO generado por la forma inducible regula tanto procesos inflamatorios como destructivos (Goldring, 2000; Martel-Pelletier et al., 2008). En relación con los tejidos articulares, los condrocitos y sinoviocitos artrósicos expresan iNOS y liberan NO espontáneamente, estando la cantidad de NO producida por el tejido artrósico en relación directa con el grado de lesión del cartílago (Amin et al., 1997; Karan et al., 2003).

La expresión de este radical se encuentra incrementada en respuesta a la estimulación con citoquinas como la IL-1 β y el TNF- α (Cillero-Pastor et al., 2012; Palmer et al., 1993; Stadler et al., 1991). Así, recientemente se ha descrito que el TNF- α eleva los niveles de la enzima argininosuccinato sintasa, la cual degrada la dimetilarginina asimétrica (ADMA), el inhibidor natural de NOS, lo cual probablemente origina un incremento en los niveles de NO (Cillero-Pastor et al., 2010). Asimismo, algunos autores describen también la existencia de una isoforma mitocondrial (mitNOS), aunque su existencia es controvertida (Lacza et al., 2009). Estudios *in vitro* recientes implican a IL-1 β en el transporte de la enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH-2) a la mitocondria de los condrocitos, una localización previamente no descrita en ningún tipo celular. DDAH-2 puede inhibir a ADMA, incrementándose así los niveles de NO (Cillero-Pastor et al., 2012). De esta manera, la mtNOS o formas de NOS asociadas a la mitocondria pueden desempeñar un papel específico en la regulación de la función mitocondrial.

El NO promueve los procesos catabólicos observados en el cartílago artrósico, además de incrementar la inflamación sinovial. Entre estos efectos nocivos del NO podemos citar: 1) inducción de apoptosis en el condrocito y sinoviocito (Blanco et al., 1995; Cillero-Pastor et al., 2012), 2) activación de MMPs en el condrocito (Murrell et al., 1995), 3) inducción de la expresión de COX-2 y síntesis de PGE_2 (Vuolteenaho et al., 2009), 4) inhibición de la expresión de IL-1Ra (Pelletier et al., 1996) y 5) inhibición de la síntesis de colágeno y proteoglicanos

(Stefanovic-Racic et al., 1996). En resumen, el NO actúa reduciendo los procesos anabólicos e incrementando los catabólicos (Martel-Pelletier et al., 2008).

3. LA MITOCONDRIA

La mitocondria es el orgánulo celular encargado de proporcionar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular, al transformar las moléculas ingeridas en energía, en forma de trifosfato de adenosina (ATP), vía el proceso de fosforilación oxidativa. Además, la mitocondria participa en otras reacciones metabólicas cruciales incluyendo el ciclo de la urea, el metabolismo lipídico, la interconversión de aminoácidos, o la síntesis de hormonas esteroideas y porfirina. La mitocondria también desempeña una función clave como sensor de la regulación glucosa/insulina, homeostasis del Ca^{2+} y la producción de ROS. A través de todas estas funciones, la mitocondria está implicada en múltiples procesos fisiológicos. Por ello, el deterioro de la función mitocondrial se ha asociado con un gran número de procesos patológicos responsables de enfermedades endocrinas (Duchen, 2004), neurodegenerativas (Kwong et al., 2006; Liu et al., 2009), cardiovasculares, y también diversas patologías articulares, entre otras (Dao-Fu Dai et al., 2012). Asimismo, en el envejecimiento se han descrito múltiples alteraciones de la actividad mitocondrial (Wei et al., 2009).

La mitocondria posee su propio material genético, y la maquinaria necesaria para sintetizar el ADN, ARN y las proteínas que codifica. El ADN mitocondrial (ADNmt) es circular y codifica 13 polipéptidos componentes de la cadena de fosforilación oxidativa, además de 2 ARNr y 22 ARNt necesarios para soportar la síntesis proteica mitocondrial; esta se caracteriza por emplear su propio código genético, ya que 4 de los 64 codones presentan un significado diferente al que poseen para la síntesis citoplasmática (Wei et al., 2009). Otras características propias del ADNmt son: 1. Poliploidía; 2. Posible presencia de heteroplasma, ya que copias mutadas pueden estar mezcladas en la mitocondria con las normales; 3. Segregación mitótica, durante la división celular (mitosis) las copias se reparten al azar; y 4. Su herencia es exclusivamente materna (Escames et al., 2012). Un hecho importante, es que el ADNmt presenta una tasa de mutación muy elevada respecto al ADN nuclear al estar más expuesto a daño oxidativo. En este sentido, las mutaciones encontradas en este ADNmt han dividido a la población mundial en diferentes haplogrupos mitocondriales. Un haplogrupo mitocondrial se define como un conjunto de variantes genéticas caracterizadas por polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) específicos. En Europa, el 95% de la población se encuentra dentro de uno de 9 haplogrupos mitocondriales diferentes.

La mitocondria está rodeada de una membrana doble: la membrana externa mitocondrial y la membrana interna mitocondrial, que delimitan dos espacios (el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial) (**figura 14**), y que se caracterizan por poseer diferentes

funciones y propiedades. La membrana externa mitocondrial posee un ratio proteína-fosfolípidos similar al que se encuentra en las membranas plasmáticas eucariotas (1:1); además, contiene las llamadas porinas, que son proteínas integrales que permiten el transporte de moléculas a través del canal interno que forman, también proteínas para un transporte activo de membrana y enzimas involucradas en múltiples actividades celulares como la elongación de ácidos grasos o degradación del triptófano (Blanco et al., 2007). La membrana interna mitocondrial también contiene proteínas encargadas del transporte de metabolitos hacia ambos lados de la matriz, y además la maquinaria encargada de las reacciones oxidativas de la CRM. Esta membrana está compartimentalizada en numerosos pliegues, llamadas crestas mitocondriales, que se expanden hacia la matriz interna del orgánulo incrementando así el perímetro de superficie de la misma, y por tanto su capacidad de generar ATP (Blanco et al., 2007; Mannella, 2006).

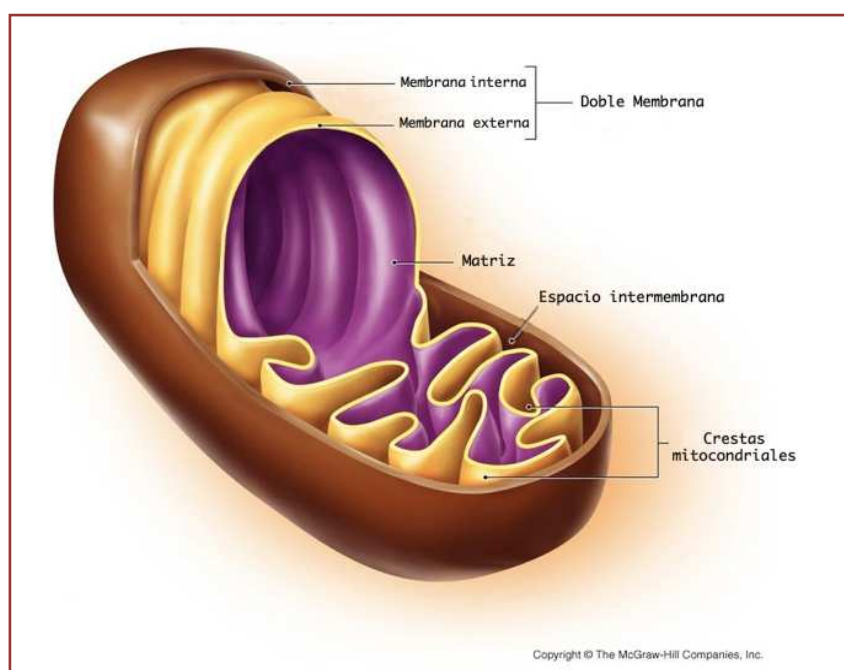


Figura 14: Estructura de la mitocondria. En la imagen se muestra la membrana doble mitocondrial (membrana externa mitocondrial y membrana interna mitocondrial), el espacio intermembrana que ambas delimitan, las crestas mitocondriales y la matriz. Imagen obtenida de la página web: <http://legacy.hopkinsville.kctcs.edu>.

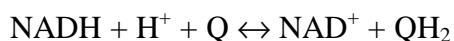
3.1. La cadena respiratoria mitocondrial

La mitocondria alberga en su membrana interna la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) formada por 4 complejos enzimáticos y responsable de la transferencia de electrones desde las moléculas NADH o FADH₂, provenientes de la glucólisis, de la degradación de los ácidos grasos y/o aminoácidos, y del ciclo del ácido cítrico, hasta el oxígeno. Este proceso genera un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial, gradiente que será utilizado por la ATP sintetasa o sintasa, o complejo V para generar ATP (consultar **figura**

15). El conjunto de estos mecanismos constituye la fosforilación oxidativa. De esta forma, en este proceso intervienen 5 complejos enzimáticos, cuyas características se describen brevemente a continuación.

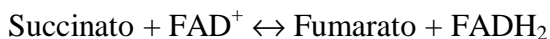
⇒ **Complejo I o NADH deshidrogenasa**

Es en este complejo donde se inicia el flujo de electrones. En él, el NADH es oxidado a NAD^+ reduciendo el grupo prostético Flavín Mononucleótido (FMN) a FMNH_2 . A su vez, los electrones de FMNH_2 son transferidos al segundo grupo prostético de este complejo, las proteínas ferro-azufre, que finalmente los transfieren a la ubiquinona (Coenzima Q) que es reducida a semiquinona (QH) y nuevamente reducida a ubiquinol (QH_2). Este proceso genera el bombeo de 4 protones (H^+) desde la matriz al espacio intermembrana a través de la membrana interna mitocondrial.



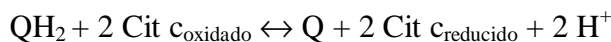
⇒ **Complejo II o succinato deshidrogenasa**

Este complejo recibe los electrones directamente del succinato mediante su oxidación a fumarato, formándose FADH_2 . A su vez, el FADH_2 transfiere sus electrones a la Q, de la misma manera que ocurría en el complejo I. Sin embargo, este complejo no es una bomba de protones, ya que el cambio de energía libre de la reacción catalizada es demasiado pequeño. Por ello, se genera menos ATP en la oxidación del FADH_2 que en la del NADH.



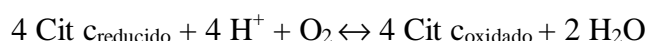
⇒ **Complejo III o citocromo c coenzima Q reductasa**

En él se cataliza la transferencia de electrones desde el QH_2 al citocromo c (Cit c). Este último es una proteína hidrosoluble transportadora de electrones que contiene un grupo prostético hemo y se encuentra en el espacio intermembrana mitocondrial. Este complejo si es una bomba de protones, y transporta 2 H^+ hacia el espacio intermembrana por cada par de electrones transferidos.

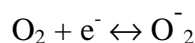


⇒ **Complejo IV o citocromo c oxidasa**

Es el último de los complejos que bombea protones. Cataliza la transferencia de los electrones del Cit c al oxígeno (O_2) para formar agua. Concretamente, capta cuatro electrones de cuatro moléculas de Cit c y se los transfiere al oxígeno para producir dos de agua y translocar otros cuatro protones al espacio intermembrana.

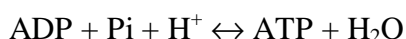


La reducción parcial de la molécula de oxígeno genera compuestos altamente reactivos. Así, se calcula que entre el 0.2 y 2.0% del oxígeno molecular empleado por la mitocondria es reducido a través de la CRM para formar el anión superóxido (O_2^-) (Staniek et al., 1999).



⇒ **Complejo V o complejo F0- F1 o ATP sintetasa**

Este complejo está situado en la cara interior de la membrana interna mitocondrial, y es el responsable directo de la síntesis de ATP a partir difosfato de adenosina (ADP), un grupo fosfato (Pi) y la energía suministrada por el gradiente de protones (H^+). En la ATP sintetasa se distinguen dos subcomplejos: el *componente F0*, un segmento hidrofóbico completamente embebido dentro de la membrana interna mitocondrial que actúa como un canal protónico; y la *fracción F1*, que es la parte del complejo orientada hacia la matriz mitocondrial, y que está formada por cinco clases de cadenas polipeptídicas. Resaltar que uniendo ambos componentes se encuentran un tallo periférico en el que se localiza la subunidad sensible a oligomicina, un inhibidor químico comúnmente utilizado para inducir disfunción del complejo V mitocondrial. En concreto, esta molécula será uno de los inhibidores de la CRM empleados en el desarrollo de esta tesis.



La hipótesis quimiostática emitida por Peter Mitchell en 1961 explica cómo la energía derivada del transporte de electrones se utiliza para producir ATP a partir de ADP y Pi. El flujo de electrones al ser acompañado por la transferencia de protones que atraviesa de la membrana interna mitocondrial a través de los complejos I, III y IV, genera un gradiente electroquímico. Por un lado, se acumulan más cargas positivas en el exterior de la membrana que en la matriz mitocondrial (gradiente eléctrico); y, por otro lado, el exterior de la membrana esta a un pH más ácido que el interior (gradiente de pH). El Dr. Mitchell postuló que la fuerza motriz protónica, que impulsa la reentrada de protones en la matriz, es utilizada por el complejo V para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi. Más tarde, en 1989, Paul Boyer demostró que el papel del gradiente de protones no es la formación de ATP en sí mismo, sino su liberación de la sintetasa a través de inducir cambios conformacionales en las subunidades de la enzima (Boyer, 2002). Añadir que, como consecuencia del gradiente de protones resultante de la actividad respiratoria, se genera una diferencia de cargas a ambos lados de la membrana interna mitocondrial que define el denominado potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$).

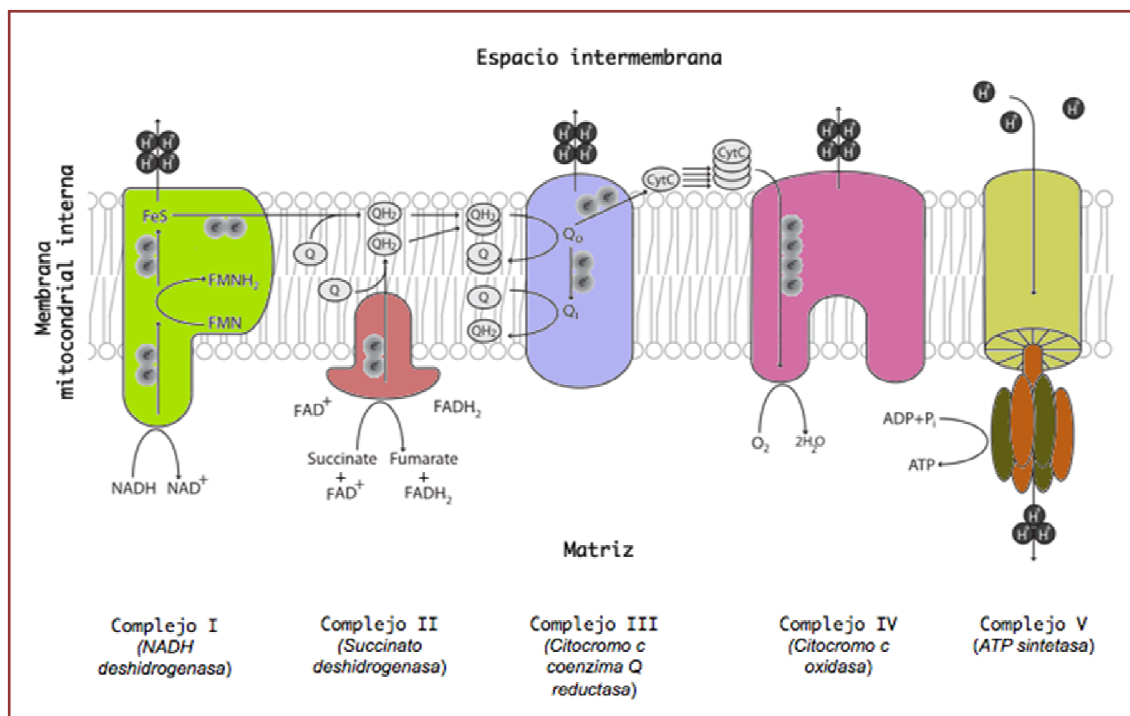


Figura 15: Complejos respiratorios mitocondriales y transporte de electrones. En la figura se ilustra como los electrones (e⁻) de la NADH y la FADH₂ atraviesan los complejos I y II respectivamente, y posteriormente al complejo III vía ubiquinol. El citocromo c transfiere electrones del complejo III al IV, el cual reduce al oxígeno para formar H₂O. El flujo de electrones está asociado a un flujo de protones (H⁺) a través de los complejos I, III y IV de la membrana interna mitocondrial, creándose un gradiente electroquímico. Finalmente, el complejo V o ATP sintetasa emplea la fuerza motriz protónica, que impulsa la reentrada de H⁺ en la matriz en sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (P_i). Imagen obtenida de Edgar, 2011.

3.2. Producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria

Los ROS engloban a una amplia variedad de moléculas y radicales libres, especies químicas con un electrón no apareado, que derivan del oxígeno molecular. El anión superóxido (O₂⁻) es el principal precursor de la mayoría de los ROS. Este radical libre puede ser producido tanto enzimática (p.e. mediante la NADPH oxidasa) como no enzimáticamente. Esto último puede ocurrir cuando un electrón es directamente transferido al oxígeno mediante coenzimas o grupos prostéticos en forma reducida. Como se describió previamente, la pérdida de electrones en la cadena de transporte de electrones puede derivar en la producción de ROS.

En la CRM hay numerosos centros REDOX que pueden dejar escapar un electrón al oxígeno, provocando que la mitocondria sea una importante fuente de O₂⁻, siendo los complejos mitocondriales I y fundamentalmente el III sus principales productores (Turrens, 2003). En condiciones fisiológicas, este proceso es eficiente y sólo un pequeño número de electrones reduce al oxígeno para producir anión O₂⁻ como un subproducto de las reacciones REDOX de la CRM. En este marco, las defensas anti-oxidantes son capaces de mantener los mecanismos de

defensa celular contra el estrés oxidativo. Sin embargo, bajo condiciones patológicas las defensas anti-oxidantes pueden no ser suficientes para contrarrestar la sobrecarga de ROS.

Además, los aniones O_2^- pueden sufrir diferentes vías de conversión (**figura 16**). Brevemente, el anión superóxido puede reaccionar con el NO para producir peroxinitrito ($ONOO^-$), un potente oxidante capaz de inhibir diversas enzimas y afectar a la integridad mitocondrial. A su vez, el $ONOO^-$ se puede descomponer rápidamente para formar nuevas especies activas como el radical hidróxido ($^{\bullet}OH$) o el dióxido de nitrógeno (NO_2), responsables de la hidroxilación y nitrilación de proteínas y lípidos. Por otra parte, y mediante una reacción espontánea o catalizada por enzimas específicas, como la superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD) o citoplasmática (CuZnSOD), el O_2^- puede ser convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este radical es el más estable de los ROS pudiendo reaccionar a distancia del sitio donde fue formado. El H_2O_2 puede ser neutralizado por la célula mediante peroxidasas como la catalasa generándose agua, o producir radicales $^{\bullet}OH$ que reaccionarían con los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas celulares (Henrotin et al., 2007). El daño oxidativo mitocondrial causado por mutágenos como ROS o RNS puede potencialmente ser la principal fuente de inestabilidad mitocondrial genómica y conducir a la disfunción de la CRM, lo cual a su vez puede generar más mutaciones en el ADNmt generándose un ciclo de daño difícil de interrumpir.

Entre la producción de ROS y los niveles de anti-oxidantes intracelulares, existe un sutil equilibrio que determinará el estado REDOX celular. Este balance puede ser modulado ligeramente por factores exógenos como la tensión de oxígeno o las citoquinas. En circunstancias patológicas, o incluso durante el envejecimiento, el estado REDOX puede estar alterado y las respuestas de las células a los factores bioquímicos modificadas totalmente.

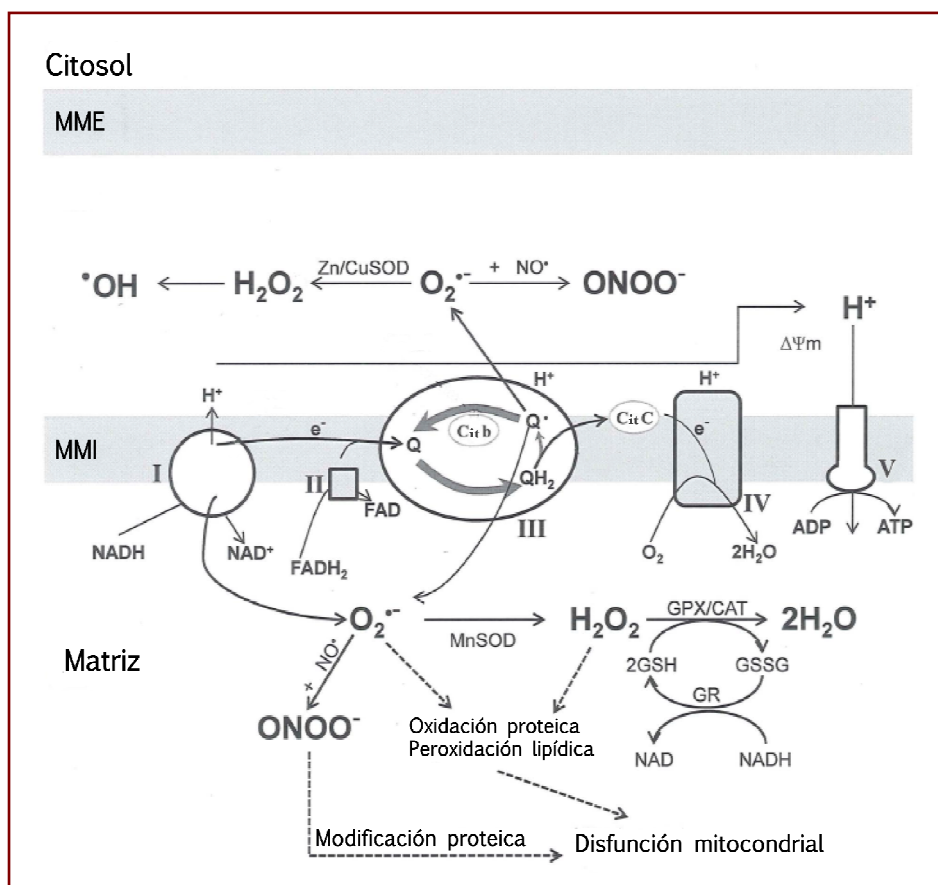


Figura 16: Formación de ROS en la mitocondria. Durante el transporte electrónico se produce el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), principalmente en los complejos mitocondriales I y III. El complejo I pierde electrones para generar $O_2^{\bullet -}$ hacia la matriz mitocondrial, mientras que el complejo II genera $O_2^{\bullet -}$ tanto hacia la matriz como hacia el espacio intermembrana mitocondrial [espacio entre membrana interna (MMI) y externa (MME)]. El radical $O_2^{\bullet -}$ sufre diferentes transformaciones dando lugar a otros radicales libres, como el hidróxido ($\cdot OH$), el peroxinitrito ($ONOO^-$) tras su unión a óxido nítrico (NO^{\bullet}), o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este último puede ser neutralizado por diferentes peroxidasas dando lugar a agua (H_2O). Los radicales libres formados pueden dañar las proteínas y lípidos presentes en la matriz induciendo la disfunción mitocondrial. SOD: superóxido dismutasa; NO: óxido nítrico; $\Delta\Psi_m$: potencial de membrana; GSH y GSSG glutatión reducido y oxidado, respectivamente; GPX, GR y CAT glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa, respectivamente. Imagen obtenida de Camara et al., 2011.

3.2.1. Señalización intracelular mediante ROS

Los ROS han sido catalogados tradicionalmente como elementos que inducen el daño celular y la destrucción de los componentes de la MEC mediante peroxidación lipídica o modificación oxidativa de proteínas y ácidos nucleicos (Martin y Buckwalter, 2002). Sin embargo, actualmente se sabe que están involucrados en un gran número de vías de señalización intracelular bajo condiciones tanto normales como patológicas. La forma en que los ROS pueden ejercer este papel, es participando como mensajeros secundarios en rutas mediadas por AP-1, MAPKs, sirtuinas, el factor inducible por hipoxia (HIF-1) o NF- κ B entre otras (Alfadda y Sallam, 2012; Henrotin et al., 2007). ROS podría de esta manera regular directamente la actividad de diferentes factores de transcripción a través, por ejemplo, de modificaciones

oxidativas en residuos conservados de cisteínas (Henrotin et al., 2003). En cuanto a la patología artrósica, se ha señalado que ROS participa en procesos apoptóticos, en la activación de MMPs y en la reducción de la síntesis de componentes de la matriz (Henrotin et al., 2003). Así por ejemplo, la generación de O_2^- y NO es necesaria en condrocitos articulares bovinos para la inhibición de la síntesis de proteoglicanos mediante IL-1 (Oh et al., 1998). Lo et al. demostró que la IL-1 β aumentaba la síntesis de colagenasas en condrocitos a través del aumento de los niveles de ROS (Lo et al., 1998).

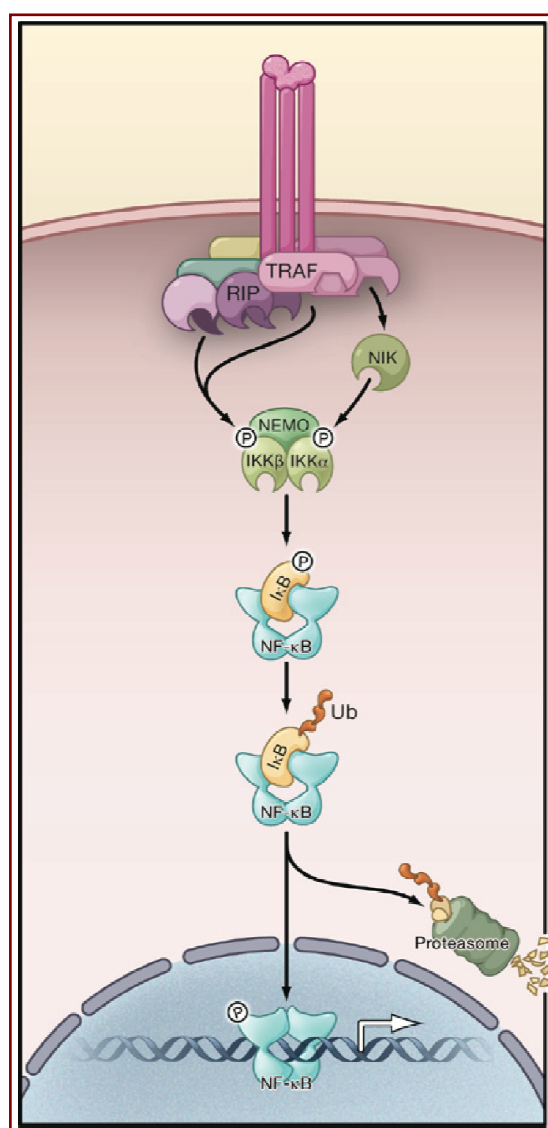


Figura 17: Activación de NF- κ B. Diferentes estímulos inducen la fosforilación de IKK a través de distintas vías canónicas (TRAF/RIP) o no canónicas (TRAFs y NIK). La activación de IKK resulta en la fosforilación de I- κ B y su consiguiente degradación en el proteosoma. El dímero NF- κ B fosforilado es translocado al núcleo, allí se une a los elementos κ B del ADN activando la transcripción de los genes diana. Imagen obtenida de Hayden y Ghosh, 2008.

3.2.1.a. ROS-NF- κ B

El complejo NF- κ B comprende una familia de factores de transcripción diméricos, cuyas subunidades puede ser RelA (p65), RelB, c-Rel (p50) y Nf- κ B2 (p52), aunque las más conocidas son p65 y p50 (Hayden y Ghosh, 2008). En su forma inactiva NF- κ B esta unido en el citoplasma a un inhibidor llamado I- κ B que impide su translocación al núcleo y por tanto su unión al ADN. Diferentes estímulos, como IL-1 β , TNF- α o los mencionados ROS, inducen la activación de este factor de transcripción, proceso llevado a cabo principalmente por la quinasa de I- κ B (IKK). Esta enzima fosforila I- κ B, desencadenando la ubiquinación de la proteína y su consiguiente degradación en el proteosoma. Una vez liberado, NF- κ B es translocado al núcleo, allí se unirá a sus elementos de unión en el ADN, induciendo la transcripción de los genes específicos. La activación de este factor de transcripción se lleva a cabo por dos principales cascadas de señalización: la vía canónica y no canónica o alternativa (**figura 17**). La primera es activada por la estimulación de receptores como el de IL-1 y TNF, mientras que el segundo incluye el receptor activador de NF- κ B (RANK) o CD40 (Brown et al., 2008).

Sin embargo, se han descrito también vías atípicas, rutas asociadas a la actividad constitutiva de este factor de transcripción durante el envejecimiento. Esta vía está ligada a la respuesta a diferentes condiciones de estrés, como son el oxidativo en los orgánulos celulares (Kriete y Mayo, 2009).

De esta forma, el aumento de los niveles de ROS citosólicos o mitocondriales podrían activar a la enzima IKK, resultando en la fosforilación de I κ -B, y por tanto la activación de NF- κ B. Este proceso podría estar mediado por diferentes quinasas, como la MAP quinasa JNK. Por el contrario, la actividad de unión al ADN de este factor de transcripción se encuentra disminuido bajo un estado oxidado de NF- κ B, inhibiendo por tanto su actividad transcripcional (Kabe et al., 2005). ROS tendría así un efecto dual sobre la actividad de NF- κ B.

En condrocitos y sinoviocitos, intermediarios catabólicos como las citoquinas IL-1 β y TNF- α activan la expresión de mediadores inflamatorios y destructivos a través de NF- κ B (Lauder et al., 2007; Marcu et al., 2010), siendo una considerable parte de esta activación mediada a su vez por diferentes ROS. Así, Mendes et al. demostró que la activación de NF- κ B mediante IL-1 β era mediada por O $_2$ (Mendes et al., 2003a). Asimismo, Del Carlo et al. observó que diferentes anti-oxidantes inhibían la activación de NF- κ B y el aumento de la expresión de MMPs que inducían fragmentos de fibronectina en condrocitos articulares humanos (Del Carlo et al., 2007).

3.2.2. Tratamientos anti-oxidantes

En la actualidad existen múltiples estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos animales, además de en ensayos humanos, encaminados a valorar el potencial efecto terapéutico de un gran número de moléculas anti-oxidantes en el tratamiento de diferentes patologías ligadas al estrés oxidativo. Como se detalló anteriormente, la OA es una enfermedad asociada al envejecimiento y a un desequilibrio en el balance REDOX celular. Así, el aumento de los niveles de ROS con la edad ha sido considerado un factor clave en el desarrollo de la OA (Henrotin et al., 2003; Loeser, 2010). En este sentido, son varios los estudios en los que se describe como mediadores inflamatorios comúnmente incrementados en la OA son capaces de aumentar la producción de ROS, y estos a su vez estimular la expresión de otros mediadores inflamatorios y destructivos en la articulación (Cillero-Pastor et al., 2008; Nelson y Melendez, 2004). Por otra parte, y confirmando la importancia del estrés oxidativo en la OA, el uso de diferentes vitaminas anti-oxidantes reduce el desarrollo de la OA en modelos animales (Kutz et al., 2002). Además, el tratamiento con vitamina E en un estudio realizado en una población geriátrica del norte de India, mostró efecto protectores frente al deterioro artrósico biomolecular inducido por el estrés oxidativo (Bhattacharya et al., 2012). Sin embargo, y en relación a esta y otras vitaminas, también se han publicado estudios que demuestran la ineficacia o un efecto modesto de estas moléculas en el tratamiento de la OA u otras patologías articulares (Brand et al., 2001; Canter et

al., 2007). Una posible explicación a este fenómeno puede radicar en las isoformas de vitamina E empleadas en estos estudios, ya que se ha detectado que estas regulan la respuesta inflamatoria con una eficacia distinta (Cook-Mills y McCary, 2010). Otras moléculas naturales prometedoras y con capacidad anti-oxidante son los polifenoles, destacando entre ellas la curcumina y el resveratrol. La curcumina es un potente agente anti-cancerígeno y anti-inflamatorio, que ejerce este último efecto, al menos en parte, a través de la inhibición de las vías de señalización de AP-1 y NF- κ B. En condrocitos estimulados *in vitro* con citoquinas

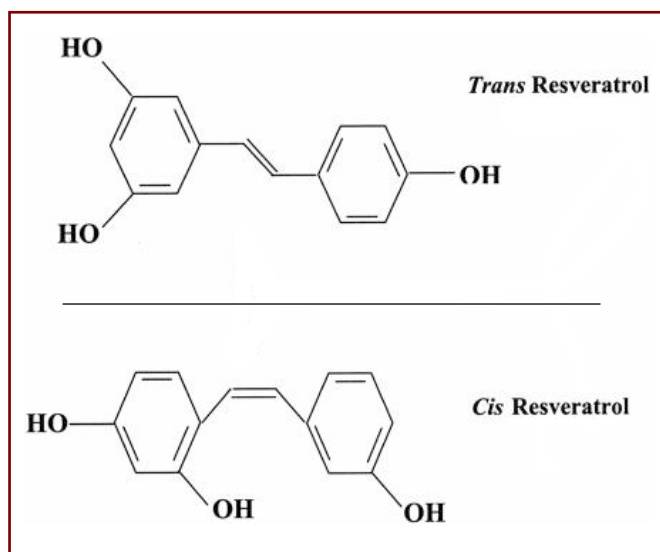


Figura 18. Estructura molecular del resveratrol. En la naturaleza el resveratrol se presenta en dos isoformas distintas, cis y trans.

catabólicas, esta molécula es capaz de reducir la expresión de mediadores inflamatorios y destructivos (Csaki et al., 2009; Shakibaei et al., 2007). Por otra parte, el resveratrol (3,4',5 trihidroxiestilbeno) es una fitoalexina que se puede encontrar en muchos alimentos naturales (uvas, frutos rojos, vino,...). En la naturaleza esta molécula se presenta en dos isoformas distintas, cis- y trans- (**figura 18**), aunque esta última es la más estable y encontrada más

comúnmente. A lo largo de la literatura actual, el resveratrol ha demostrado una destacable capacidad anti-inflamatoria, anti-tumoral, inmunomoduladora, cardioprotectora, anti-oxidante y anti-envejecimiento entre otras (monográfico resveratrol, 2010). Al igual que ocurriría con curcumina, gran parte de estos efectos son debidos a su habilidad de inhibir la señalización de NF- κ B (Csaki et al., 2009). Recientemente, se ha descrito que los efectos beneficiosos de resveratrol en patologías metabólicas asociadas a la edad, son en parte mediados por la activación de AMPK (proteína quinasa activada por AMP) y la consecuente actividad de sirtuina 1 (Park et al., 2012). En relación a su potencial uso en la prevención o mejora de condiciones patológicas como la OA, se han observado efectos condroprotectores y anti-apoptóticos *in vitro* como *in vivo* en modelos animales de daño articular (Elmali et al., 2005, 2007; Shakibaei et al., 2009).

No todos los agentes anti-inflamatorios empleados comúnmente son anti-oxidantes, un ejemplo de este caso es el diclofenaco. Este AINE puede causar apoptosis a través de su habilidad de inducir disfunción mitocondrial, ya que reduce la síntesis y actividad de la isoforma mitocondrial de la enzima anti-oxidante SOD (SOD2). De esta manera, el uso de anti-oxidantes como curcumina y resveratrol junto a AINEs habitualmente empleados en el

tratamiento de la OA, se presenta como una alternativa terapéutica prometedora (Mobasheri et al., 2012).

3.3. La mitocondria en la artrosis

Clásicamente no se ha considerado a la mitocondria como un elemento clave en la patogenia de la OA debido a que el cartílago se localiza en un ambiente hipóxico por ser un tejido avascular; por ello, los condrocitos del cartílago articular se han calificado como células principalmente glicolíticas, con una baja actividad de la CRM. Sin embargo, actualmente se conoce que el oxígeno difunde desde el líquido sinovial hasta las diferentes capas que constituyen el cartílago (Falchuk et al., 1970; Lund-Olesen, 1970). De esta forma, se estima que las capas superficiales reciben un 5-7% de oxígeno (frente al 13% de la sangre arterial) (Zhou et al., 2004), mientras que en los condrocitos de las regiones más profundas la tensión de oxígeno es únicamente del 1% (Marcus, 1973). Por otro lado, los condrocitos poseen mitocondrias, siendo estas más numerosas en la superficie que en la zona profunda. Estos orgánulos poseen las enzimas necesarias para desempeñar la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones (Henrotin et al., 2007). Además, se ha demostrado que condrocitos humanos en cultivo presentan niveles similares de actividad enzimática de la CRM a la observada en otras células mesenquimales (Maneiro et al., 2003). De hecho, se ha descrito que hasta un 25% del ATP producido por la célula procede de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Henrotin et al., 2007). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la mayoría de estos resultados han sido obtenidos en modelos estándares *in vitro*, lo que significa que los condrocitos han sido cultivados con altas concentraciones de glucosa (4.5 mM) y bajo condiciones aeróbicas (alta tensión de oxígeno). En este sentido, recientes hallazgos *in vitro* muestran que la hipoxia regula de forma diferente el proteoma de condrocitos humanos normales y artrósicos, incluso de algunas proteínas mitocondriales. Las células OA muestran menor modulación que los condrocitos normales, lo que significa que los condrocitos OA tienen menor capacidad de reaccionar en un medio hipóxico (Ruiz-Romero et al., 2010).

3.3.1. Disfunción mitocondrial en la artrosis

En la última década se ha demostrado que muchos de los procesos, tanto fisiológicos como patológicos, que ocurren en el condrocito están mediados por la mitocondria ya sea directa o indirectamente. De esta manera, alteraciones en algunas de las funciones mitocondriales, como la producción de ATP, la homeostasis del calcio o el estado REDOX pueden explicar algunos de los mecanismos que inducen la degradación del cartílago por los condrocitos durante la OA, destacando el estrés oxidativo, la muerte celular del condrocito, el incremento de la respuesta inflamatoria y destructiva de la MEC y la calcificación de la matriz del cartílago.

En este sentido, uno de los dos estudios cuyos resultados incrementaron de forma notable el interés de los investigadores por la implicación de la mitocondria en la patología artrósica, fue el publicado en el año 2004 por Johnson et al. en el que se demostraba que la disminución en la reserva bioenergética mitocondrial era un factor patogénico de la artropatía degenerativa, así como en el desarrollo de condrocalcinosis en el envejecimiento (Gibson et al., 2008; Johnson et al., 2004; Shapiro et al., 1982). Así, múltiples estudios han demostrado que la mitocondria del condrocito está especializada en el transporte del calcio, subrayando su importancia en las microcalcificaciones presentes en el cartílago OA (Blanco et al., 2011). El otro trabajo fue desarrollado por nuestro grupo, y describe que la actividad de los complejos I, II y III de la CRM y el $\Delta\psi_m$ están disminuidos en el condrocito OA en relación con el condrocito normal (Maneiro et al., 2003). Asimismo, la masa mitocondrial está incrementada en el cartílago artrósico, como se demuestra por un aumento significativo de la actividad citrato sintasa, enzima utilizada como marcador de la masa mitocondrial. Posiblemente, el incremento de la masa mitocondrial podría ser uno de los mecanismos utilizados por la célula para compensar la deficiencia en la producción de ATP (Maneiro et al., 2003). En este sentido, la inhibición de la síntesis de ATP con un inhibidor del complejo III (antimicina A) y con un inhibidor del complejo V (oligomicina), induce un incremento en los niveles de ROS y en la producción de estímulos pro-inflamatorios y catabólicos (PGE_2 y MMPs) (Cillero-Pastor et al., 2008, 2013); así como una destacada disminución en la síntesis de colágeno y proteoglicanos (Johnson et al., 2000), características todas ellas presentes en la patología OA.

Otro aspecto fundamental en el que está implicada la mitocondria y también característico del cartílago OA es el proceso de apoptosis (Kim y Blanco, 2007). Precisamente, diversos estudios histológicos en el cartílago OA muestran una reducción en el número de condrocitos comparado con el del cartílago normal (Stockwell, 1967). Así, diferentes autores han sugerido que un incremento en los procesos apoptóticos podría ser uno de los causantes de este fenómeno (Aigner y Kim, 2002). Por otra parte, la autofagia, un mecanismo protector en el cartílago normal, que se encarga de renovación de orgánulos como la mitocondria durante procesos de estrés celular, se encuentra comprometida durante la OA, pudiendo participar este evento en el desarrollo de esta patología (Caramés et al., 2010). Además, se ha descrito que la inhibición de este mecanismo en el condrocito está bajo control de la proteína desacopladora 3 mitocondrial (UCP-3) (Watanabe et al., 2008).

Como ya se ha mencionado, la patología artrósica está asociada con un incremento en la producción de ROS por los condrocitos en el cartílago. En este sentido, y como se comentó anteriormente, la mitocondria es una de las principales localizaciones productoras de ROS (Turrens, 2003). Estas especies reactivas actúan como mediadores de señalización intracelular en procesos fisiológicos como son el mantenimiento de la homeostasis iónica del cartílago (Gibson et al., 2008), o la remodelación de la matriz extracelular (Henrotin et al., 2003). Sin

embargo, una excesiva producción de ROS y el deterioro en el sistema de defensa anti-oxidante produciría un daño oxidativo en tejido articular, evento que podría estar involucrado en el desarrollo de la OA (Henrotin et al., 2007; Loeser, 2010). De este modo, mutaciones somáticas en el ADNmt inducida por mutágenos como ROS o NO, podrían contribuir al fallo en la actividad mitocondrial que ocurre en los condrocitos artrósicos (Kwong et al., 2006; Wei et al., 2009). De hecho, los resultados de un estudio del 2009 indican que hay una disminución en la integridad del ADNmt y una mayor acumulación de daño en el ADNmt en condrocitos de pacientes con OA en relación con los condrocitos de individuos normales (Grishko et al., 2009). Asimismo, la capacidad de reparación del ADNmt esta mermada en estas células.

Según acabamos de mencionar, las mutaciones del ADNmt pueden ser consecuencia de un incremento en la producción de ROS así como también de defectos en el sistema anti-oxidante mitocondrial (Turrens, 2003). Un secuestrador importante de ROS es la SOD, que cataliza la reacción de superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno. Y concretamente, la SOD2, que como ya se comentó, es la enzima encargada de proteger a la mitocondria del estrés oxidativo generado en ella (Turrens, 2003). Una deficiencia en esta enzima puede dar lugar a la formación de otras especies oxidadas como el peroxinitrito. En relación con los condrocitos artrósicos, dos estudios demuestran que la expresión de esta enzima esta disminuida en los condrocitos de pacientes con OA, y que esta reducción en sus niveles se asocia con disfunción mitocondrial (Ruiz-Romero et al., 2009; Gavrilidis et al., 2013).

3.3.2. Modulación de la actividad mitocondrial en la artrosis

Hoy en día, se cree que las mutaciones en el ADNmt que definen a los diferentes haplogrupos no son patológicas *per se*. Sin embargo, podrían modular funciones biológicas importantes e influir en el desarrollo de enfermedades complejas o enfermedades relacionadas con el envejecimiento humano. En concreto, individuos con el haplotipo J poseen un consumo de oxígeno menor al que presentan individuos de otros haplogrupos. Este fenómeno se ha vinculado con una menor eficiencia de la CRM lo que supondría una menor producción de ATP, pero también de ROS (Chen et al., 2012). Así, diversos estudios europeos, han descrito que los portadores del haplogrupo J presentan mayor longevidad (De Benedictis et al., 1999) y un menor riesgo de padecer la enfermedad de Parkinson (Huerta et al., 2005). En relación con la patología artrósica, se ha demostrado que el haplogrupo mitocondrial J protege al individuo del riesgo a padecer OA de rodilla y de cadera (Rego-Pérez et al., 2008; Rego et al., 2010). En contraposición, los individuos que poseen el haplogrupo U presentan una mayor severidad radiológica en la OA de rodilla (Rego-Pérez et al., 2008).

La actividad de los complejos mitocondriales en el condrocito puede verse modulada a consecuencia de diferentes moléculas catabólicas presentes en el cartílago y líquido sinovial artrósico. Diversos autores han descrito como las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β ,

que se encuentran en altas concentraciones en el líquido sinovial y tejidos articulares de las articulaciones afectadas por OA, regulan la función mitocondrial en condrocitos humanos en cultivo, al reducir la actividad del complejo I de la CRM, y en consecuencia la producción de ATP; además de provocar una reducción en el $\Delta\psi_m$ e inducir daño en el ADNmt (Kim et al., 2010; López-Armada et al., 2006b). Asimismo, las citoquinas TNF- α e IL-1 β son capaces de modular el proceso apoptótico en el condrocito OA humano a través de la activación de caspasas ejecutoras en un modelo de muerte apoptótica celular (Caramés et al., 2008). Otro mediador fundamental en la patología artrósica es el NO. Diversos estudios sugieren que el NO induce apoptosis en el condrocito al reducir la actividad del complejo IV de la CRM e inducir la despolarización de la membrana mitocondrial, además de importantes daños en el ADNmt, con consecuencias en la viabilidad del condrocito (Maneiro et al., 2005). Por último, mencionar que en condrocitos artrósicos, la prostaglandina PGE₂ disminuye el potencial de membrana mitocondrial, así como la generación de ATP (Dave et al., 2008).

Mención aparte merecen los DAMPs de origen mitocondrial, moléculas procedentes de la mitocondria que han sido liberadas tras un daño celular, ya sea por necrosis, apoptosis u otro tipo de muerte. Estas moléculas actúan como ligandos de TLR o RAGE activando vías inflamatorias y catabólicas en el cartílago articular. Dentro de ellos encontraríamos el ADNmt, citocromo c o los ROS (Krysko et al., 2011). Este último puede modular la respuesta inmune de otros DAMPs tras provocar modificaciones oxidativas en ellos, como es el caso de HMGB1 (proteína 1 del grupo de alta movilidad), una molécula que ha sido asociada al desarrollo de la OA (Goldring y Otero, 2011), y que es capaz de promover y aumentar la respuesta inflamatoria en el condrocito y sinoviocito.

3.3.3. Disfunción mitocondrial y tejido sinovial

Clásicamente, la mayor parte de los estudios realizados en la patología artrósica han estado centrados en el cartílago. Sin embargo, hoy en día conocemos que todos los componentes de la articulación se ven afectados por esta alteración articular. Con respecto al tejido sinovial, y dado que es un tejido bien vascularizado y aerobio, es razonable pensar que una buena integridad y funcionalidad mitocondrial sea esencial para la supervivencia del sinoviocito. Por otro lado, bajo una situación patológica, la membrana sinovial también se ve sometida a condiciones de hipoxia. Así, sinoviocitos en cultivo en condiciones de hipoxia sufren una alteración en el potencial de membrana mitocondrial (Biniecka et al., 2011) que puede originar un incremento en los niveles de estrés oxidativo. Este estrés puede contribuir a activar un fenotipo inflamatorio en el sinoviocito. Por otra parte, también *in vitro*, se ha descrito como el NO reduce la supervivencia en sinoviocitos artrósicos al modificar la función mitocondrial, concretamente induciendo la despolarización de la membrana mitocondrial, reduciendo los niveles de ATP, y aumentando la actividad de los complejos I y III (Cillero-Pastor et al., 2011).

En la misma línea, se ha observado una clara asociación entre un ambiente inflamatorio sinovial y la presencia de mutagénesis en el ADNmt de los sinoviocitos (Harty et al., 2012). Finalmente, diferentes estudios han demostrado como proteínas reguladas por la mitocondria, como es la familia de bcl-2, regulan la viabilidad del sinoviocito (Byun et al., 2008; Perlman et al., 2000).

4. MODELOS ANIMALES DE ARTROSIS

Los modelos animales representan una herramienta esencial en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos, además de ayudar en el desarrollo de agentes terapéuticos y en la identificación de marcadores biológicos para el diagnóstico y pronóstico de diferentes enfermedades humanas. En relación con la OA, debido a la condición heterogénea de la misma, la identificación de un modelo apropiado para el estudio de esta patología es difícil. De esta manera, se han descrito múltiples modelos empleando una gran variedad de especies animales, entre los que se incluyen modelos espontáneos de OA, modelos inducidos por manipulación mecánica o quirúrgica de la articulación, o modelos químicos en los que la afectación de los condrocitos o de la MEC daría lugar a una patología comparable a la OA. Cada uno de ellos cursa de manera distinta, lo que puede ser de utilidad para reproducir las distintas formas con que se desarrolla la enfermedad. Así, los modelos espontáneos representarían un inicio temprano de la enfermedad. Mientras que la OA por manipulación del animal se podría equiparar a la OA secundaria. Por otra parte, las especies empleadas comúnmente (ratón, rata, caballo, cerdo, conejo,...) poseen diferentes características anatómicas y fisiológicas que las hacen más o menos apropiadas según el estudio a desarrollar (**tabla 3**). Por este motivo, los objetivos marcados, cuestiones económicas o los aspectos concretos a investigar, además de otras consideraciones del estudio a realizar, determinan el modelo a emplear.

4.1. Modelos de artrosis en rata

Los modelos de OA espontánea en rata son muy poco comunes. Por ello, los modelos más frecuentes en esta especie animal son los quirúrgicos, concretamente mediante ruptura del menisco medial y/o sección transversal del ligamento cruzado anterior; o los químicos, por inyección intraarticular de un agente químico o enzimático, como es el yodoacetado de sodio. Mediante estas dos aproximaciones, se obtienen cambios degenerativos en el cartílago de progresión rápida caracterizados por una pérdida en la densidad celular y en el contenido de proteoglicanos, además de fibrilación y formación de osteofitos. Estos modelos también se usan habitualmente para evaluar los efectos terapéuticos y toxicológicos de los tratamientos potenciales de la OA. Además, y ya que las ratas poseen una degeneración espontánea muy pequeña en sus articulaciones de rodilla (Smale et al., 1995), las lesiones observadas en ellas son generalmente un resultado de su manipulación, lo que las hace buenas candidatas para su

empleo en modelos de OA inducida. Otra ventaja importante de esta especie animal es que son animales de fácil manipulación y económicos. Por último, su principal desventaja es que aportan poco material para realizar el estudio.

Tabla 3: Características de los diferentes animales empleados en los modelos de artrosis en relación con la especie humana

Especie	Edad de maduración	Grosor del cartílago tibial y femoral *	Densidad del volumen condrocitario *	Edad mínima recomendada para desarrollo de modelo OA
Humano	15-20 años	2.2 mm	2%	
Conejo	8 meses	0.2-0.4 mm (fémur)	2-12%	8-9 meses
Rata	7-8 semanas*	0.17 mm (fémur)	10-25%	3 meses
Oveja	> 2 años	Fémur: 0.6-1 mm Tibia: 0.5-1.5 mm (machos de 2-3 años)	5-10% (machos de 2 a 4 años de edad)	2 años
Perro	10-18 meses (en función de la raza)	0.6-1.3 mm	2-12%	
Cabra	> 2 años	0.6-1.7 mm	6-7%	2 años
Caballo	2 años	2 mm	1.5-6%	2 años
Ratón	7-8 semanas*	0.003 mm (fémur)	15-40%	10 semanas
Cerdo Guinea	7 meses (fémur) y 12-18 meses (tibia)	0.3 mm (tibia a los 6 meses de edad)	15%	6 meses

* Valores dados para animales adultos, que varían en función de la región de la articulación, capa del cartílago o edad del animal

* La maduración en estos roedores se refiere a la madurez sexual, ya que la placa de crecimiento permanece abierta en el adulto.

Tabla 3: Características de los diferentes animales empleados en los modelos de artrosis en relación con la especie humana. En la tabla se describen los diferentes animales empleados para el desarrollo de los modelos de OA, y sus características y recomendaciones a tener en cuenta a la hora de su elección. Tabla extraída de Aigner et al., 2010.

4.2. Modelos animales de disfunción mitocondrial

La gran mayoría de los estudios simulando un deterioro de la función mitocondrial han sido realizados *in vitro* o *ex vivo*, y apenas existen trabajos *in vivo* que confirmen la función que la mitocondria juega en la OA. Aproximaciones mediante el uso de ratones transgénicos o de silenciamiento han resultado fallidos a causa de los efectos letales a nivel embrionario (Blanco et al., 2011). Por esta razón, actualmente se ha optado por provocar experimentalmente mutaciones *de novo* en el ADNmt de nueva generación (Trifunovic, 2006). Una de las formas de conseguirlo, es eliminando la actividad exonucleasa (y por tanto la capacidad reparadora) de la subunidad γ de la ADN polimerasa (POLG), mientras que su actividad polimerasa se mantiene conservada, de tal manera que los errores durante la replicación no son corregidos acumulándose mutaciones en el ADNmt. Así, los ratones homocigotos para esta enzima *polg*^{-/-} presentan una apariencia normal a las 8 semanas de vida, pero a las 25 semanas comienzan a mostrar signos frecuentes del envejecimiento como pérdida de peso, alopecia, cardiomiopatías, y osteoporosis entre otros. Se ha planteado la posibilidad del estudio de la patología artrósica en estos animales, aunque hay que tener en cuenta que se están induciendo un alto grado de mutaciones mitocondriales en todos los tejidos del animal y no solo a nivel articular. Por otro lado, Inoue et al (2000) generó el llamado ‘mito-ratón’, ratones con una delección en el par de

bases 4696 del ADNmt, que es equivalente a la delección en el sitio 4977 del ADNmt humano. Estos ratones muestran numerosos síntomas de enfermedades mitocondriales, con acumulación con la edad de delecciones en el ADNmt de tejidos somáticos (Liu et al., 2009). Finalmente, también se han realizado otras aproximaciones como la modificación de genes anti-oxidantes como la SOD 1 y 2, y la glutatión peroxidasa 1 (Wallace et al., 2009). En general, estos modelos animales han demostrado que mutaciones en el ADNmt, o alteraciones en la función mitocondrial pueden sensibilizar al animal hacia marcadores apoptóticos, y síntomas de envejecimiento prematuro y de enfermedades degenerativas y mitocondriales, como es el caso de la OA.



II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Imagen obtenida de http://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Statue_of_Robin_Hood_near_Nottingham_Castle

La artrosis (OA) es una de las enfermedades asociadas a la edad más común. Se trata de una patología articular degenerativa que se caracteriza por la degradación progresiva del cartílago articular hialino que finalmente se traduce en la pérdida gradual de la función articular. Por ello, y a pesar de no conocer con exactitud la etiopatogenia de la OA, la teoría más extendida sitúa en el cartílago el inicio de la enfermedad, al perderse en el condrocito el equilibrio entre los procesos anabólicos (síntesis de matriz extracelular) y catabólicos (degradación de matriz extracelular) que mantiene la integridad de la MEC (Martel-Pelletier et al., 2008). Así, los estímulos pro-inflamatorios son los principales inductores del programa catabólico en el condrocito, lo que sugiere que una respuesta inflamatoria no controlada en el tejido articular podría participar activamente en el establecimiento y evolución de esta patología. En este sentido, la importancia de la inflamación en la patología artrósica ha adquirido importantes nuevas dimensiones.

Por otro lado, clásicamente no se ha tenido en cuenta a la mitocondria como un elemento importante en la patogenia de la OA debido a que los condrocitos del cartílago articular se han considerado células altamente glicolíticas, con una baja actividad de la CRM a causa de la ausencia de vascularización, y por situarse en un ambiente hipóxico. Sin embargo, en la última década existen numerosos datos publicados que otorgan a la mitocondria un papel decisivo en el desarrollo de la patología artrósica (Blanco et al., 2011; Roach, 2008; Terkelatub et al., 2002). En concreto, se ha demostrado la influencia del polimorfismo mitocondrial J en poseer un menor riesgo de desarrollar OA de rodilla o ralentizar su evolución (Rego-Pérez et al., 2008). Asimismo, nuestro grupo ha descrito que los condrocitos procedentes de pacientes artrósicos presentan una disfunción mitocondrial, con un descenso en la actividad de los complejos I, II y III en relación con la de condrocitos de donantes sanos (Maneiro et al., 2003). De esta forma, alteraciones en algunas funciones mitocondriales, como la producción de ATP, la modulación de los niveles de Ca^{2+} y el estado REDOX de la mitocondria pueden explicar algunos de los mecanismos que inducen la degradación del cartílago durante la OA. En particular, y en relación al fenotipo inflamatorio, se ha demostrado recientemente que la disfunción mitocondrial *per se* genera un proceso inflamatorio y de degradación de la matriz de bajo grado en condrocitos humanos normales en cultivo (Cillero-Pastor et al., 2008; 2013). Sin embargo, hasta el momento no ha sido abordado el efecto de la disfunción mitocondrial en el condrocito sobre la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas.

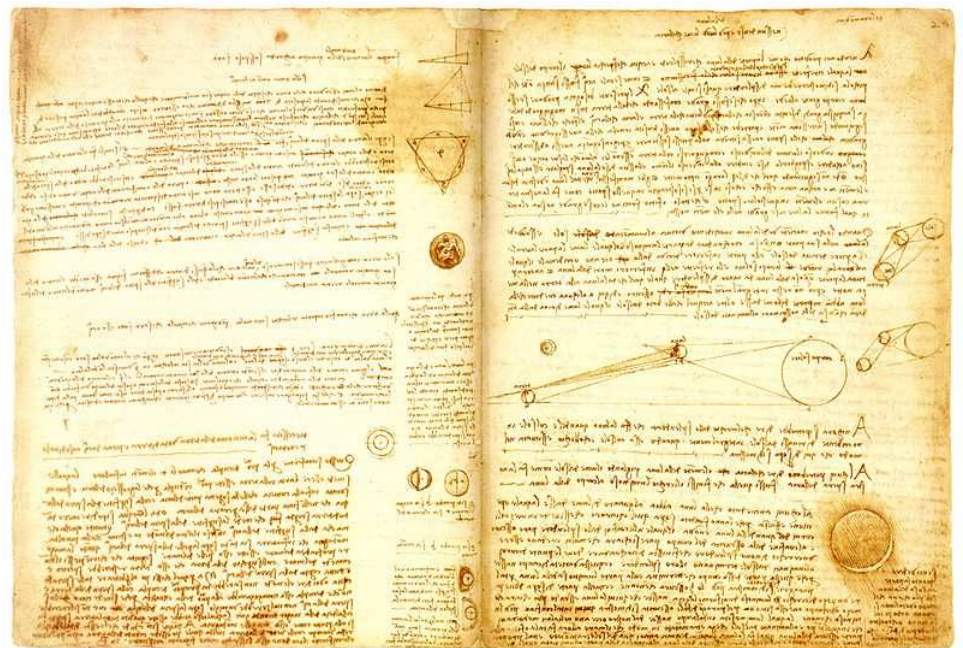
Asimismo, a pesar de que existen diversos modelos experimentales que evalúan como la alteración en la función mitocondrial puede sensibilizar al animal a desarrollar enfermedades degenerativas, lo cierto es que hasta el momento no existe ningún modelo experimental de inducción de disfunción mitocondrial que examine el papel de la alteración de este orgánulo en el daño articular.

Por todo ello, en esta tesis se profundizara en la participación de la mitocondria en el desarrollo de la respuesta inflamatoria presente en la patología artrósica mediante dos abordajes diferentes. El primer abordaje, examinara el efecto *in vitro* de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas en el condrocito. Y un segundo abordaje, analizara *in vivo* la respuesta inflamatoria en un modelo murino de daño articular por disfunción mitocondrial.

Los objetivos concretos desarrollados en esta tesis son:

1. Evaluar la relación entre la disfunción de la CRM y la expresión de IL-8 en el condrocito.
 - a. Efecto sobre la expresión génica y proteica de IL-8 en condrocitos humanos normales en cultivo.
 - b. Estudio de la modulación de IL-8 en explantes de cartílago.
2. Examinar el efecto de la disfunción de la CRM sobre la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas en condrocitos humanos normales en cultivo.
 - a. Analizar el efecto de la disfunción mitocondrial sobre la expresión génica y proteica de IL-8 inducida por IL-1 β . Estudio funcional de quimiotaxis.
 - b. Estudiar el efecto de la disfunción mitocondrial sobre la modulación de la expresión de COX-2 y PGE₂ inducida por IL-1 β en condrocitos.
 - c. Evaluar el efecto de la inhibición de la CRM sobre el perfil inflamatorio inducido por TNF- α .
3. Analizar el efecto del silenciamiento de una proteína del complejo V de la CRM sobre la expresión inflamatoria inducida por IL-1 β en una línea celular inmortalizada de condrocitos humanos.
 - a. Validar en la línea celular el efecto modulador de la inhibición química del complejo V mitocondrial sobre la expresión génica y proteica de IL-8 inducida por IL-1 β .
 - b. Estudiar el efecto del silenciamiento de una proteína del complejo V mitocondrial sobre la síntesis de IL-8 inducida por IL-1 β .
4. Investigar la implicación de ROS, NF- κ B y vías de muerte celular en la modulación de la respuesta inflamatoria a citoquinas inducida por la disfunción mitocondrial en condrocitos humanos normales en cultivo.

5. Analizar el efecto de resveratrol sobre la modulación de la respuesta inflamatoria a citoquinas inducida por la disfunción mitocondrial en condrocitos humanos normales en cultivo.
6. Evaluar la respuesta inflamatoria en un modelo murino *in vivo* de daño articular por disfunción mitocondrial.
 - a. Evaluación macroscópica del daño articular.
 - b. Evaluación microscópica del daño articular.
 - c. Determinación de la expresión de mediadores inflamatorios.
 - d. Valoración del estrés oxidativo.



III. MATERIALES Y MÉTODOS

Imagen obtenida de http://en.wikipedia.org/wiki/File:Vinci_-_Hammer_2A.jpg

A. ESTUDIOS EN EXPLANTES DE CARTÍLAGO Y CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS EN CULTIVO

1. CULTIVO CELULAR

1.1. Obtención de muestras a partir de cartílago articular humano

El cartílago humano se obtuvo de rodillas y caderas procedentes de autopsias de donantes de órganos, fracturas de cuello femoral o bien de rodillas procedentes de amputaciones de 40 pacientes adultos de la Xerencia de Xestión Integrada de A Coruña (XXIAC) (edad media de 63 ± 11 años; 22 hombres y 18 mujeres) sin historial clínico de patología articular previa. El procedimiento de obtención de las muestras fue aprobado por el Comité Ético de Galicia. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes cuando las muestras provenían de fracturas de cuello femoral o amputaciones. Y la autorización de la familia cuando las muestras fueron obtenidas de autopsias. Todas las muestras se recogieron de forma anónima.

1.2. Cultivo primario de condrocitos articulares

Una vez obtenidas las muestras de tejido articular, el cartílago se separó del hueso subcondral con ayuda de un bisturí, obteniéndose láminas finas de cartílago a partir de las cabezas o cóndilos femorales y de los platillos tibiales. A continuación, el tejido se troceó y se trató con una solución de tripsina 0.5 mg/ml (Sigma-Aldrich, San Luis, MA, EEUU) durante 15 minutos (min) a 37°C en agitación. Posteriormente se eliminó dicha solución, y se digirió con 2 mg/ml de colagenasa IV (Sigma) en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Life Technology, Paisley, Reino Unido) enriquecido con 5% de suero de bovino fetal (SBF; Life Technologies) en un agitador orbital a 37°C toda la noche con agitación intensa. El producto de la digestión se centrifugó 10 min a 1800 rpm, se resuspendió en DMEM enriquecido con 10% SBF suplementado con 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco, Invitrogen) y se cultivo en frascos de 162 cm² (Costar, Cambridge, Reino Unido) a 37°C en estufa humidificada con 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron la confluencia se realizaron subcultivos con tripsina 0.05%-Ácido etilenominotetraacético (EDTA) 0.02% (Gibco). Todos los experimentos posteriores se desarrollaron en el segundo subcultivo, tras alcanzar los condrocitos un 90% de confluencia.

1.3. Caracterización de células condrocíticas

Por microscopía óptica se observó, como característica anatómica de estas células, un aspecto poligonal. Además, no se observaron formas características de otro tipo celular. Mediante estudios de inmunohistoquímica, las células presentaron tinción positiva para el colágeno tipo II

(marcador característico de condrocitos) y negativa para el colágeno tipo I, excluyendo de esta forma su desdiferenciación a fibroblastos (consultar **figura 19**).

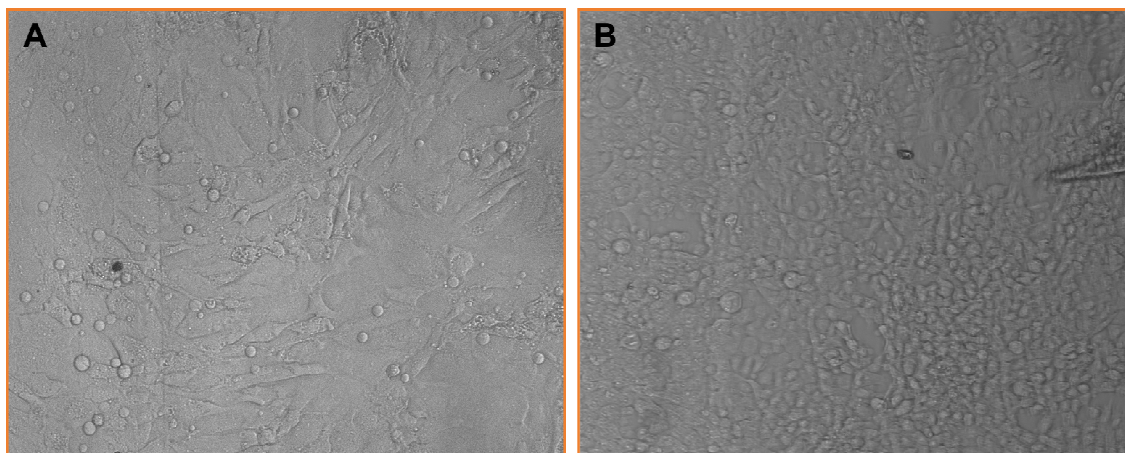


Figura 19: *Aspecto al microscopio óptico de los condrocitos humanos en cultivo (A) y la línea celular de condrocitos T/C-28a2 (B). Aumento a 100X.*

1.4. Explantes de cartílago articular

A partir de algunas láminas de cartílago no digerido, y con la ayuda de un sacabocados, se extrajeron explantes de cartílago cilíndricos de 6 mm de diámetro. A continuación, los explantes se cultivaron en placas de 48 pocillos y se estimularon debidamente.

1.5. Cultivo de una línea celular de condrocitos: T/C-28a2

La línea celular de condrocitos T/C-28a2 fue cedida amablemente por la doctora Mary Goldring del Laboratorio de Biología del Cartílago del Hospital para Cirugía Especial de Nueva York (**figura 19**). Esta línea celular fue obtenida mediante transfección retroviral de condrocitos humanos con el antígeno T grande del virus Simian 40 (SV40). El cultivo de estas células T/C-28a2 se realizó en medio DMEM enriquecido con un 10% de SBF y suplementado con 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco).

1.6. Condiciones experimentales y estímulos empleados

En función del tipo de estudio a realizar, los condrocitos se sembraron en placas de diferente tamaño (Costar): placas de 6 pocillos para los análisis de ARNm, western blot o citometría de flujo; placas de 12 pocillos para la obtención de los sobrenadantes del ensayo de quimiotaxis; placas de 24 pocillos para la realización de los experimentos de quimiotaxis; placas de 96 pocillos para el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o de viabilidad por MTT; y finalmente, en portaobjetos acoplados a soporte de 8 pocillos para los estudios de inmunocitoquímica o de tinción con DAPI. Cuando las células alcanzaron la confluencia se hicieron quiescentes antes de la estimulación, incubándolas en medio DMEM suplementado con

0.5% de SBF durante 48 horas (h) en el caso de los condrocitos en cultivo primario; o bien, 24 h en el caso de la línea celular. Transcurrido este periodo, se realizó un lavado y los condrocitos se incubaron en condiciones basales o en presencia de los diferentes estímulos en medio sin SBF.

Para las determinaciones de IL-8, en los estudios de inmunohistoquímica y citometría de flujo se añadió el reactivo GolgiStop™ [0.7 µl/ml; Becton Dickinson (BD), Nueva Jersey, EEUU] 4 h antes de finalizar el tiempo de incubación. Este reactivo contiene monensin, una molécula que evita la secreción proteica; y por tanto, las proteínas quedan retenidas en el interior de la célula.

Todos los estímulos empleados en el desarrollo de este trabajo se resuspendieron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En la **tabla 4**, se indican las concentraciones empleadas de cada uno de ellos.

Tabla 4: Lista de estímulos y concentraciones empleadas		
Estímulo	Concentración utilizada	Casa Comercial
Antimicina A (AA)	10, 20, 40 µg/ml	Sigma
Oligomicina (OLI)	5, 10, 20 µg/ml	Sigma
IL-1β	0.1, 0.5, 1, 1.5, 5 ng/ml	Sigma
TNF-α	5, 10 ng/ml	Sigma
N-acetilcisteína (NAC)	40 mM	Sigma
Resveratrol (RSV)	50, 250 µM	Sigma
Bay-117085	5 µM	Calbiochem
zDEVD-FMK	50 µM	BD
zVAD-FMK	50 µM	BD
GolgiStop™	0.7 µl/ml	BD

Tabla 4: Lista de estímulos y concentraciones empleadas en las diferentes condiciones experimentales.

2. TRANSFECCIÓN CELULAR

Esta técnica fue utilizada para suprimir la expresión de la proteína del complejo V de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) que confiere sensibilidad a oligomicina (OSCP). La transfección se realizó mediante electroporación, técnica que origina un incremento en la conductividad eléctrica y en la permeabilidad de la membrana plasmática celular, haciendo así posible la entrada de ARN pequeño de interferencia o de silenciamiento (siARN). Se utilizó el electroporador Amaxa® Nucleofector II (Lonza, Colonia, Alemania), y el *kit V Amaxa® Cell Line Nucleofector®* (Lonza) específico para la línea celular de condrocitos T/C-28a empleada en este ensayo siguiendo el procedimiento indicado por la casa comercial. Brevemente, los condrocitos en un 80% de confluencia se tripsinizaron y se resuspendieron en un número de 1×10^6 células en 100 µl de la solución de transfección (nucleofactor®) mezclándose en una cubeta de electroporación AMAXA con 300 nM de siARN de OSCP (combinación de tres ARN con secuencias específicas complementarias al ARNm que codifica para OSCP, Invitrogen) o con 300 nM de siARN control inespecífico [siARN control (SC), ARN con una secuencia de 20-25 nucleótidos que no es complementaria a ningún ARNm humano; Santa Cruz, Dallas, TX, EEUU], o en la ausencia de estos (condición basal: ‘no transfectadas’). A continuación se aplicó el programa específico de AMAXA para esta línea celular (X-001). Después de la transfección, las

células se repartieron cuidadosamente en placas de cultivo de diferente tamaño dependiendo del estudio a realizar, y se incubaron en DMEM 10% suplementado a 37°C durante 12 h. El plásmido *pmaxGFP*[®], un plásmido que codifica para la proteína fluorescente GFP, se utilizó como control de eficacia de la transfección. La eficacia de la transfección, evaluada mediante citometría de flujo tras la transfección de 2 µg *pmaxGFP*[®], fue de un 90%.

3. CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR E INTEGRIDAD NUCLEAR

3.1. Ensayo de viabilidad por MTT

La viabilidad celular se cuantificó en placas de 96 pocillos a razón de 12×10^3 células/pocillo empleando el ensayo colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El fundamento de este método se basa en que las células metabólicamente activas tienen la capacidad de escindir las sales de tetrazolio para formar sales insolubles de formazán. Para este procedimiento, se añadieron 10 µl de MTT (5 mg/ml) diluidos en tampón fosfato salino (PBS) en pocillos que contenían 100 µl de medio. Tras 4 h de incubación en estufa a 37°C, se añadieron 100 µl de tampón de solubilización [SDS (Sodio dodecil sulfato) al 10% en HCl 0.01M] para disolver las sales de formazán. Finalmente, transcurridas 18 h de incubación en estufa húmeda, se cuantificó la reacción colorimétrica en un lector de placas (Labsystem[®] Multiskan Plus; Thermo Labsystems, Helsinki, Finlandia) a la longitud de onda de 570 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de MTT metabolizado, considerando los valores obtenidos en la condición basal como el 100%.

3.2. Estudio de la integridad nuclear por tinción DAPI

La morfología nuclear fue evaluada empleando el fluoróforo 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI, λ de excitación 350/emisión 470 nm, Sigma). Para realizar este estudio los condrocitos se sembraron en portaobjetos acoplados a un soporte de 8 pocillos, y a una densidad de 2×10^4 células por pocillo. Transcurrido el tiempo de estimulación se lavaron con PBS pH 7.4, se fijaron con 100 µl de acetona durante 10 min a 4°C, y a continuación se dejaron secar a temperatura ambiente. En este punto se pudo congelar o continuar la técnica. Posteriormente, se lavó el portaobjetos con PBS, y se incubaron todos los pocillos, a excepción del control negativo, con 200 µl de DAPI (2 µg/ml) en PBS durante 10 min en oscuridad. A continuación, las placas se lavaron con PBS, y se montaron con glicerol al 90% en PBS. Finalmente, los núcleos se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 (Olympus Biosystem, Hamburgo, Alemania) conectado a una cámara digital DC100 Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), o se guardaron a 4°C hasta su evaluación.

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

El análisis de la expresión génica se compone de tres fases descritas a continuación: extracción y cuantificación, reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real.

4.1. Extracción y cuantificación del ARN

El ARN se aisló de células sembradas en placas de 6 pocillos (5×10^5 células/pocillo; 2 pocillos por condición) bajo las diferentes condiciones experimentales, empleando el reactivo Trizol LS (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se lavaron con PBS pH 7.4 a 4°C, y se les añadió 300 µl de Trizol LS. Tras 5 min de incubación, se recogió el lisado resultante, y se añadió cloroformo, lo que permitió la separación del ARN en una fase acuosa. A continuación, se añadió isopropanol a esta fase acuosa, precipitando de esta forma el ARN. La cuantificación de la concentración de ARN se realizó empleando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, EEUU) a través de su absorbancia a 260 nm, y se valoró la pureza de la muestra hallando el ratio entre su absorbancia a 260 y a 280 nm.

4.2. Retro-transcripción del ARNm

Una vez cuantificado el ARN, se ajustó siempre que fue posible la concentración de las muestras a 500 ng/µl. A continuación, y con el fin de eliminar posibles impurezas de ADN antes de realizar el ensayo de retro-transcripción, se trató 1 µg del ARN con 1 µl de desoxirribonucleasa I 1U/µl junto con 1 µl de tampón de reacción 10X [Tris-HCl (pH 8.4) 200 mM, MgCl₂ 20 mM, KCl 500 mM] (Invitrogen), y se llevó la mezcla hasta un volumen total de 10 µl con agua de PCR. La reacción se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, y finalmente se detuvo añadiéndole 1 µl de EDTA 25 mM (pH 8.0) durante 10 min a 65°C.

Para realizar la retro-transcripción se utilizó el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La síntesis del ADNc se llevo a cabo con cebadores oligo-dT. Por cada µg del ARN se añadió 1 µl del cebador oligo (dT)₁₈ 50 pmol/µl, agua de PCR hasta completar un volumen total de 13 µl, y se incubó la muestra a 65°C durante 10 min, lo que conlleva la desnaturalización de las estructuras secundarias del ARN. Finalizado este paso, se añadieron 4 µl del tampón de reacción 5X, 0.5 µl de inhibidor de ARNasa 40 U/µl, 2 µl de mezcla de desoxinucleótidos 10 mM y 0.5 µl de la enzima reverso transcriptasa 20 U/µl, completando así un volumen final de 20 µl. Posteriormente se introdujo la muestra en un termociclador y se le aplicó un programa de 30 min a 55 °C para que se produjera la reacción de retro-transcripción, tras los cuales se inactivo la enzima calentándola 5 min a 85°C. Finalmente la reacción se detuvo enfriando la muestra a 4°C. Las muestras se congelaron a -20°C hasta el momento de realizar los ensayos de PCR a tiempo real.

4.3. Cuantificación de la expresión génica mediante PCR a tiempo real

Para desarrollar esta fase es necesario en primer lugar realizar el diseño de los cebadores. Este diseño se llevo a cabo empleando la herramienta informática *Universal Probe Library Tool* disponible en la página web de Roche (<http://www.roche-applied-science.com>). Las parejas de cebadores utilizadas para el análisis de la expresión génica de interleuquina 8 (IL-8), ciclooxigenasa 2 (COX-2), OSCP, y porfobilinógeno deaminasa (PBGD) se describen en la **tabla 5**. La fase de cuantificación se desarrolló con el kit comercial *LightCycler 480 SYBR Green I Master* (Roche) empleando el termociclador *LightCycler 480* (Roche) y siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, la mezcla de PCR contenía *Fast Start Taq DNA Polymerase*, dNTPs, $MgCl_2$, además del fluoróforo *SYBR® Green* que se une específicamente a ADN de doble hebra. A 5 μ l de esta mezcla se añadió 2 μ l de ADNc (obtenido en la retro-transcripción) y los μ l de cebadores directos y reversos necesarios para alcanzar la concentración óptima establecida para cada uno (consultar **tabla 5**). Finalmente, se completo la reacción con agua libre de ADNasas hasta un volumen final de 10 μ l. Cada muestra se amplificó por duplicado para cada gen.

Tabla 5: Lista de cebadores				
Gen	Cebador directo 5'→3'	Cebador reverso 5'→3'	Amplicón (nt)	Concentración empleada
IL-8	agacagcagagcacaagc	atggctccttcggtggt	62	0.3 μ M por cada cebador
OSCP	tgccacagctctttattctgc	ggctcctcaggatttgctgc	93	0.3 μ M por cada cebador
COX-2	tgggaagccttctctaacctc	ttgtatgctatctgagccgtcta	103	0.4 μ M por cada cebador
PBGD	agctatgaaggatgggcaac	ttgtatgctatctgagccgtcta	70	0.3 μ M por cada cebador

Tabla 5: Lista de cebadores empleados para la obtención de los productos de amplificación de interés. El diseño de los cebadores se realizó empleando la herramienta informática *Universal Probe Library Tool* disponible en la página web de Roche (<http://www.roche-applied-science.com>).

El programa de PCR empleado se dividía en un primer ciclo de incubación de 10 min a 95°C para la desnaturalización del ADN y activación de la enzima *Fast Start Taq DNA Polymerase* polimerasa; y a continuación, un programa de amplificación de 45 ciclos repartidos a su vez en tres etapas: 1) desnaturalización de 10 segundos a 95°C, 2) hibridación durante 5 segundos a 60°C, y 3) extensión de 5 segundos a 72°C. Durante esta última etapa tiene lugar la emisión de fluorescencia al intercalarse el *SYBR® Green* entre las bases del ADN, lo que permite la cuantificación relativa de los niveles de expresión génica del gen de interés, ya que la intensidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de producto amplificado, y por tanto, a los niveles de ARNm de este gen. Los resultados de cada experimento se analizaron mediante el programa informático *Relative Expression Software Tool*, que compara grupos tratados frente a los no tratados, teniendo en cuenta la eficiencia de la reacción y la normalización de los resultados por el gen de referencia. El gen PBGD se utilizó como normalizador de los niveles relativos de expresión génica. La expresión de este gen no se encontró modulada en el

condrocito por las diferentes condiciones empleadas; y además, sus niveles de expresión eran similares al de los genes de estudio, lo que convirtió a PBGD en un buen gen de referencia para estos estudios.

5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN PROTEICA Y LIPÍDICA

El análisis de la expresión proteica se desarrolló empleando diferentes abordajes: citometría de flujo, ELISA, *western blot* e inmunocitoquímica. Mientras que la expresión lipídica, concretamente la de PGE₂, se analizó mediante ELISA.

5.1. Cuantificación proteica mediante citometría de flujo

Mediante esta técnica se analizó la expresión de las proteínas COX-1, COX-2 e IL-8. Para estos estudios, los condrocitos se sembraron en placas de 6 pocillos (Costar) con una densidad de 5×10^5 células/pocillo en 1 ml de medio de cultivo. Finalizado el tiempo de estimulación, las células se tripsinizaron y recolectaron, y tras un lavado en suero salino, se permeabilizaron y fijaron, respectivamente, con saponina 0.2% (Sigma) y paraformaldehído al 4% (Sigma) PBS, durante 10 min a temperatura ambiente. Las uniones inespecíficas se bloquearon con 2 lavados en PBS al 0.5% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) (PBS-BSA 0.5%). Posteriormente las células se resuspendieron en 20 μ l de PBS, e incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo marcado frente a la proteína de interés: 7.5 μ l de anti-IL-8 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, λ de excitación 490/emisión 525 nm) (Abcam, Cambrigde, Reino Unido); o 10 μ l de la mezcla de anticuerpos conteniendo anti-COX-1 marcado con FITC/anti-COX-2 marcado con ficoeritrina (PE, λ de excitación 490/emisión 767 nm) (BD). Finalmente, las células se lavaron con PBS-BSA, se resuspendieron en 200 μ l de PBS 1X y se analizaron en un citómetro BD FACScalibur (BD) hasta completar un número total de 10000 células. El canal FL-1 del citómetro mostró la señal positiva para COX-1 e IL-8, mientras que el canal FL-2 la positividad para COX-2. Para cuantificar la expresión de IL-8 se empleó como control negativo células incubadas con un anticuerpo anti-IgG marcado con FITC, mientras que para la valoración de la expresión de COX-1/COX-2 se utilizaron células incubadas con un anticuerpo anti-IgG marcado con FITC y un anticuerpo anti-IgG marcado con PE. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa informático *CellQuest Pro 5.1* (BD), y se expresaron como la mediana de la intensidad de fluorescencia de la población celular.

5.2. Cuantificación proteica mediante *western blot*

Mediante esta aproximación se analizó la expresión de la proteína mitocondrial OSCP en los condrocitos T/C-28a2 tranfectados con siOSCP. A continuación, se detalla brevemente los pasos para realizar esta técnica.

5.2.1. Extracción y cuantificación de los extractos proteicos celulares

Para llevar a cabo este estudio, los condrocitos se sembraron en placas de 6 pocillos (Costar) con una densidad de 5×10^5 células/pocillo en 1 ml de medio de cultivo. Transcurrido el tiempo de estimulación las células se lavaron dos veces con PBS frío a pH 7.4 y se recogieron empleando un tampón de lisis (**tabla 6**) previamente calentado a 56°C. En el momento previo a su uso, al tampón de lisis se le añadió 10 µl/ml de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma) y 10 µl/ml de fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF; 0.1 mM) (Sigma). A continuación, las muestras se hirvieron a 100°C durante 5 min, se cuantificaron, y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

La cuantificación de los extractos proteicos se realizó con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop) mediante la lectura de la absorbancia a 280 nm.

Tabla 6: Tampones empleados en la realización de la técnica western blot.	
Nombre	Composición
Lisis	2 ml SDS al 10%, 2 ml Glicerol, 2 ml Tris-HCl 1M pH 6.8 y 4 ml H ₂ O
Carga 5X	10 ml SDS al 10%, 30 ml glicerol, 25 ml Tris-HCl 1M pH 6.8, 45 ml H ₂ O, 10 mg azul de bromofenol β-mercaptoetanol (100 µl/ml al momento del uso)
Electroforesis	Tris-Base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS al 0.1%
Transferencia	Tris-Base 48 mM, Glicina 39 mM, SDS al 0.037%, Metanol 20%
Lavado	Tween 20 al 0.1%, NaCl 0.1 M, Tris 0.01M pH 7.5
Rojo Ponceau	Ponceau al 0.1%, Ácido acético al 5%
Bloqueo	Leche desnatada al 5% en tampón de lavado

Tabla 6: Composición de los tampones empleados en la realización de la técnica western blot.

5.2.2. Separación electroforética SDS-PAGE

La separación de las proteínas extraídas se realizó en función de su peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida de 1.5 mm de grosor. Se empleó un gel concentrador de acrilamida al 7.5%, y a continuación uno propiamente ‘separador’ al 12.5% (**tabla 7**). Se cargaron 60 µg de cada extracto proteico en una relación 1:4 con un tampón de carga que contenía a su vez β-mercaptoetanol (Sigma). La mezcla se hirvió a 100°C durante 10 min y a continuación se incubó en hielo 15 min. La electroforesis se desarrolló a 35 mA durante 90 min usando el sistema *Mini-Protean III* (Bio-Rad, Richmond, CA, EEUU).

Tabla 7: Composición de los tampones empleados en la separación electroforética			
	Casa comercial	Gel concentrador (7.5 %)	Gel Separador (12.5%)
Tris-HCl 1 M	Sigma	375 µl (pH 6.8)	3.73 ml (pH 8.8)
H ₂ O	-	2.1 ml	1.97 ml
Acrilamida/bisacrilamida (30:0.8)	Bio-Rad	500 µl	4.2 ml
SDS 10%	Sigma	30 µl	100 µl
PSA 10%	Sigma	15 µl	50 µl
TEMED	Sigma	1.5 µl	5 µl

Tabla 7: Composición de los tampones empleados en la preparación de los geles utilizados en la separación electroforética.

5.2.3. Transferencia a membrana

Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore CO, Bedford, MA, EEUU) de aproximadamente el mismo tamaño que el gel. Previamente, las membranas se equilibraron mediante incubaciones consecutivas de 5 min en metanol, agua y nuevamente metanol. A continuación, la membrana, el gel resultante de la electroforesis y dos papeles absorbentes se sumergieron durante 15 min a 4°C en tampón de transferencia (**tabla 6**). La transferencia tuvo lugar a 20 V durante 40 min empleando el aparato *Trans-Blot semi-dry Transfer Cell* (Bio-Rad). En esta membrana se llevó a cabo la inmunodetección de las proteínas a estudiar. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con tampón de lavado. Finalmente, para confirmar que la transferencia se había desarrollado correctamente, la membrana se tiñó con Rojo *Ponceau* (Sigma).

5.2.4. Inmunodetección

Para evitar uniones inespecíficas, la membrana se trató con tampón de bloqueo (**tabla 6**) durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación continua. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo frente a la proteína de interés, el anticuerpo primario, en solución de bloqueo a 4°C y en movimiento constante toda la noche (**tabla 8**). Transcurrido este tiempo, y tras lavar la membrana (5 lavados de 6 min), se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario es un anticuerpo contra las IgG del animal en el que está desarrollado el anticuerpo primario (**tabla 8**). De nuevo, se procedió al lavado de la membrana como se indicó anteriormente, y finalmente se detectó la banda proteica correspondiente a la proteína de interés empleando el kit de revelado por quimioluminiscencia (ECL) (GeHealthcare). La reacción se fundamenta en que la peroxidasa ligada al anticuerpo secundario unido a la membrana es capaz de transformar el sustrato luminol en 3-aminofalato. Este producto enzimático emite luz a 428 nm lo que permite su visualización usando una cámara de revelado (LAS3000; Fujifilm, Tokio, Japón). En todos los casos, se utilizó la tubulina como control de carga, ya que su expresión en la célula es alta y no se encuentra alterada por ninguno de los estímulos empleados.

Tabla 8: Lista de anticuerpos empleados en el western blot

Anticuerpo	Casa comercial	Animal de origen	Concentración
Anti-OSCP	Invitrogen	Ratón	0.1 µg/ml
Anti-Tubulina	Sigma	Ratón	1:2500
Anti IgG de ratón-HRP	Santa Cruz	Cabra	1:1000

Tabla 8: Lista de anticuerpos empleados en este estudio en la técnica de western blot.

5.2.5. Cuantificación y análisis de los datos

Para cuantificar la cantidad de proteína detectada mediante esta técnica, se calculó la intensidad de la señal obtenida por cada banda mediante el programa informático ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, EEUU). Este programa asigna un valor arbitrario de señal

de quimioluminiscencia a una región de la imagen seleccionada por el usuario, en la que reside la banda de la proteína de interés. Posteriormente, se corrigen los valores obtenidos dividiendo este dato por el adquirido para su control de carga, la tubulina, en el mismo experimento. Finalmente los datos se expresaron como número de veces de la expresión proteica respecto de la condición basal, designada como 1.

5.3. Inmunocitoquímica

Este estudio analizó la expresión proteica intracelular de IL-8 empleando el sistema de detección *Dako REAL™ EnVision Peroxidase/DAB+* (Dako, Glostrup, Dinamarca). Los condrocitos sembrados en placas de 8 pocillos (2×10^4 células/pocillo), se estimularon, se lavaron con PBS pH 7.6 y se fijaron con 100 μ l de acetona durante 10 min a 4°C. A continuación, se dejó secar el portaobjetos a temperatura ambiente. En este punto se pudo congelar o continuar la técnica. Tras un lavado con PBS, la actividad peroxidasa endógena se inhibió utilizando un inhibidor de peroxidasa endógena comercial (Dako) durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se realizó un nuevo lavado, y se incubaron todos los pocillos, a excepción del control negativo, con un anticuerpo primario para IL-8 (anticuerpo policlonal anti-IL-8 humano de conejo, 1:500; Invitrogen) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, y tras tres lavados con PBS de 10 min, se incubaron todos los pocillos, incluido el control negativo, con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, y tras tres lavados, se añadió el cromógeno 3,3-diaminobenzidina tetraclorhidrato (DAB). Este compuesto actúa de sustrato para la peroxidasa, rindiendo un producto de color marrón que sirve como indicador de la cantidad de anticuerpo unido, y por tanto de la cantidad de proteína en la célula. Transcurridos 3 min la reacción enzimática se frenó con agua destilada. Finalmente, y para localizar las reacciones proteína-anticuerpo dentro del contexto celular, se contratiñeron las células con hematoxilina de Gil III durante 2 min, y se realizó un aclarado con agua destilada hasta que la preparación adquirió un color azulado. Posteriormente, y tras una deshidratación de las preparaciones en etanol de gradación creciente (70°, 96°, 100°) y xilol, se montaron los portaobjetos con la resina sintética DePeX (VWR International, Leicester, Inglaterra) y un cubreobjetos. Las células se visualizaron en el microscopio Olympus BX61 (Olympus Biosystem) acoplado a una cámara digital DC100 Leica (Leica Microsystems).

5.4. Cuantificación proteica mediante ELISA: IL-8

Para estos estudios, los condrocitos se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 5×10^4 células/pocillo en 100 μ l de medio. Una vez finalizado el tiempo de estimulación, las placas se centrifugaron 10 min a 1800 rpm, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C hasta el momento de la determinación.

La cantidad de IL-8 secretada se cuantificó mediante un kit comercial de ELISA (ImmunoTools GMBH, Friesoythe, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recubrió el fondo de pocillos de placa de 96 con un anticuerpo frente IL-8. Posteriormente, se añadieron en los pocillos los sobrenadantes a evaluar. La cantidad de proteína unida al anticuerpo se determinó mediante el sistema biotina-estreptavidina y la reacción colorimétrica peroxidasa-sustrato. La sensibilidad del ELISA es de 2 pg/pocillo, y el rango de trabajo entre 1.0-240 pg de IL-8/pocillo. Los resultados se expresaron en pg de IL-8 por número de células o por mg de tejido, en relación con los valores obtenidos a partir de la curva estándar.

5.5. Cuantificación fosfolipídica mediante ELISA: PGE₂

Para estudiar la concentración de PGE₂ en los sobrenadantes, los condrocitos se sembraron en placas de 96 pocillos en un número de 5×10^4 células/pocillo en 100 µl de medio. Tras la estimulación correspondiente, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C hasta el momento de la determinación.

La medida de la cuantificación de PGE₂ se llevo a cabo mediante un ELISA competitivo comercial (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron en pocillos de placa de 96 recubiertos con un anticuerpo anti-ratón tres compuestos: un anticuerpo frente a PGE₂ hecho en ratón, PGE₂ conjugada con peroxidasa, y los sobrenadantes de cultivo a testar. Tras un periodo de incubación, donde la PGE₂ de la muestra compitió con el conjugado por su unión al anticuerpo, se agregó a los pocillos un sustrato para la enzima peroxidasa y se cuantificó la reacción colorimétrica resultante. La señal detectada era inversamente proporcional a la cantidad de PGE₂ presente en las muestras de cultivo. La sensibilidad del ELISA es de 2 pg/pocillo, y el rango de trabajo entre 2.5-320 pg/pocillo. Los resultados se expresaron en pg de PGE₂ por número de células, en relación con los valores obtenidos a partir de la curva estándar.

6. ENSAYO DE RETARDO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA): ACTIVIDAD DE NF-κB

Esta técnica permitió detectar la capacidad de unión del factor nuclear κB (NF-κB) a su secuencia consenso, lo que refleja la translocación de este desde el citoplasma al núcleo y su activación. Los pasos que se siguieron para el desarrollo de esta técnica se detallan a continuación.

6.1. Extracción y cuantificación de los extractos proteicos nucleares

Para el estudio de la activación del factor de transcripción NF-κB, los condrocitos se sembraron en placas de 6 pocillos a razón de 5×10^5 células/pocillo. Los extractos nucleares se

obtuvieron después de 1 h de estimulación empleando un kit comercial de extracción nuclear (Affimetrix, Santa Clara, CA, EEUU) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, transcurrido el tiempo de incubación, las placas se lavaron con PBS pH 7.4 frío, se añadió 250 μ l de tampón A, al que previamente se le habían agregado inhibidores de fosfatasas y proteasas, y se pusieron a agitar en un orbital a 200 rpm durante 10 min en frío. A continuación, se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a 14000 g 3 min en frío, y el precipitado resultante se resuspendió en tampón B (con inhibidores de fosfatasas y proteasas) y se incubó durante 1 h en hielo. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 14000 g durante 5 min a 4°C, y se recogió el sobrenadante, correspondiente a la fracción nuclear. Los extractos proteicos nucleares se cuantificaron y almacenaron a -80°C. La cuantificación se realizó mediante el método Lowry (Bio-Rad), empleando BSA para calibrar las medidas. Este método estima la concentración proteica en base a las uniones del ión Cu^{++} a los grupos NH de los enlaces peptídicos (reacción de *Biuret*), y la presencia en la muestra de los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas.

6.2. EMSA

La detección de NF- κ B se realizó utilizando el kit comercial de retardo en gel para NF- κ B (Affimetrix) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los extractos proteicos nucleares (6 μ g) en un volumen de 6 μ l se incubaron con 1 μ l de Poli d (I-C) y 2 μ l de tampón de unión 5X durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1 μ l de la sonda específica de NF- κ B marcada con biotina y se facilitó su unión al factor de transcripción NF- κ B mediante una incubación de 30 min a 15°C. La unión se detuvo añadiendo 1 μ l de tampón de carga. Para verificar que las uniones fueran específicas se realizaron ensayos de competición en algunas muestras con un exceso 100 veces molar de sonda fría (sin marcaje) y, a continuación, se prosiguió el ensayo añadiéndoles la sonda marcada. Asimismo, como control positivo de la técnica, se incubó una sonda específica marcada de NF- κ B con 2 μ l de extracto nuclear Hela y nuevamente se realizó el protocolo habitual.

El complejo factor de transcripción-sonda de ADN se separó del exceso de sonda no unida en un gel no desnaturalizante de poliacrilamida al 6% de 1.5 mm de grosor (**tabla 9**). La electroforesis se realizó a 120 V a 4°C durante 1 h empleando el sistema *Mini-Protean III* (Bio-Rad). A continuación, el gel se transfirió sobre una membrana de nylon *HybondTMN⁺* (GeHealthcare) empleando el aparato de transferencia *Trans-Blot semi-dry Transfer Cell* (Bio-Rad) a 12 V durante 45 min. Concluida la transferencia, se fijaron los oligos mediante radiación con luz ultravioleta (UV) durante 5 min en el aparato *Bio-link* (Vilber Lourmat, Paris, Francia). La membrana se pudo guardar a temperatura ambiente envuelta en papel. A continuación, la membrana se bloqueó, se incubó con estreptavidina marcada con peroxidasa, y se reveló la

reacción quimioluminiscente producida siguiendo la instrucciones del fabricante en una cámara de revelado (LAS3000; Fujifilm).

Tabla 9: Reactivos empleados en la separación electroforética	
	Composición
TBE 10X	54 g Tris-Base, 27.5 g Ácido bórico, 20 ml EDTA pH 8.0 0.5M
Gel de electroforesis para EMSA	0.5 ml TBE 10X 2 ml Acrilamida/bis 30% (29:1) 312.5 ml Glicerol 80% 7.187 ml Agua estéril desionizada 150 µl PSA al 10% 10 µl TEMED

Tabla 9: Reactivos empleados para la separación electroforética de los extractos nucleares.

7. ESTUDIO DE QUIMIOTAXIS

El objetivo de estos estudios fue confirmar la capacidad funcional de la quimioquina IL-8 liberada por los condrocitos. Esta quimioquina se caracteriza por inducir la migración de neutrófilos. Por ello, se realizaron estudios de quimiotaxis empleando neutrófilos circulantes de individuos sanos y sobrenadantes del cultivo de los condrocitos sometidos a las diferentes condiciones experimentales.

7.1. Aislamiento de células polimorfonucleares

Las células polimorfonucleares (PMN) humanas se aislaron mediante gradiente de densidad siguiendo un procedimiento estándar. Brevemente, 3 ml de sangre humana extraídos en tubos con el anticoagulante EDTA se diluyeron con salino en una relación 1:1. A continuación, 6 ml de esta mezcla se añadieron sobre 4 ml de *Histopaque*, y se centrifugaron a 2000 rpm 30 min. A la fracción del fondo del tubo, que contiene los neutrófilos y eritrocitos, se le añadió gelatina (Sigma) al 2.5% y se incubó 15 min a 37°C, separándose ambos tipos celulares mediante sedimentación. Finalmente, se recogió la fracción que contenía los PMN, y se sometió a un choque hipoosmótico para lisar los eritrocitos contaminantes. Los PMN, en su mayoría neutrófilos, se resuspendieron en medio de cultivo RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) con un 5% SBF a una concentración de 1×10^7 células/ml.

7.2. Ensayo de quimioataxis

Los ensayos de quimiotaxis se realizaron en placas de 24 pocillos con unos soportes permeables *Transwell* (cámara superior, Costar) que contenían en su base una membrana de policarbonato de 3 µm de poro. En el fondo de los pocillos (cámara inferior) se colocaron 600 µl del sobrenadante condicionado de condrocitos que se iba a evaluar, y en los soportes *Transwell* situados dentro estos pocillos, se añadieron 100 µl de la suspensión atemperada de neutrófilos

(1×10^7 células/ml). Las placas fueron incubadas durante 1 h a 37°C para permitir la trans migración celular y los neutrófilos que migraron hacia la cámara inferior se cuantificaron empleando el citómetro de flujo *BD FACScalibur* (BD). Para ello, en primer lugar la población de neutrófilos se caracterizó y definió en un densitograma utilizando el programa *Cell Quest pro* (BD). Definida la región, las muestras se analizaron en el citómetro cuantificando el número de eventos que se situaron dentro de dicha región. Para estimar la cantidad de neutrófilos que atravesaron específicamente por quimioatracción la membrana *Transwell*, se restaron los neutrófilos que atravesaron la membrana en el control negativo, medio DMEM 0%, al número de neutrófilos obtenido en cada condición evaluada. Para descartar el posible efecto quimioatrayente *per se* de la oligomicina, se realizaron controles con medio de cultivo DMEM con oligomicina en el compartimento inferior.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron en las unidades correspondientes como la media \pm el error estándar (EE), o como la media del porcentaje de variación \pm EE respecto al control. Las muestras se estudiaron individualmente o en duplicado, y en ningún caso, células de diferentes muestras fueron agrupadas para realizar los distintos estudios. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad PRISM versión 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EEUU), aplicando el análisis de varianza ANOVA de una cola y el test de Friedman. Cuando se quisieron realizar comparaciones entre grupos se empleó el test pareado de Wilcoxon. Las diferencias se consideraron significativas estadísticamente cuando la P fue menor o igual a 0.05.

B. ESTUDIOS EN UN MODELO ANIMAL DE DAÑO ARTICULAR

1. DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE DAÑO ARTICULAR POR DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

Como complemento a los estudios realizados *in vitro* se planteó un segundo bloque experimental en el que se evaluó *in vivo*, si la disfunción mitocondrial podría desencadenar una respuesta inflamatoria en la articulación similar a la descrita *in vitro*. Para ello, se desarrolló un modelo experimental en el que se inyectó intraarticularmente un inhibidor de la función mitocondrial, la oligomicina.

Dado que el objetivo principal del estudio fue analizar la respuesta inflamatoria más que la destructiva, se optó por un modelo de daño articular agudo. En concreto, se desarrolló el protocolo descrito por Scharstuhl en ratones C57Bl/6 (Scharstuhl et al., 2002), introduciendo una serie de modificaciones que se detallan en el siguiente apartado.

1.1. Animales, grupos experimentales y desarrollo del modelo

Los estudios se llevaron a cabo en ratas Wistar Han RccHan hembras (Laboratorios Harlan Interfauna Ibérica, España) con un peso entre 180-220 g (4-6 meses de edad). Los animales permanecieron estabulados en el animalario de la XXIAC con ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad y condiciones estables de temperatura (22°C) y humedad. Los animales dispusieron de libre acceso a agua y pienso (SAFE; Laboratorios Harlan Interfauna Ibérica). Todos los procedimientos realizados en el estudio cumplen la normativa vigente en la Unión Europea (2010/63/EU) y España (53/2013), y han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la XXIAC.

Los animales se dividieron en 3 grupos experimentales de 15 individuos cada uno: grupo sano, grupo lipopolisacárido (LPS, Sigma), y grupo oligomicina (OLI, Sigma). El grupo LPS, en base a la literatura previa, se empleó como control positivo de respuesta inflamatoria (Idogawa et al., 1998). El daño articular se indujo tras la inyección intraarticular en las patas traseras de 10 µg de LPS o 20 µg de OLI, en los días 0, 2, y 5 del desarrollo del modelo. El grupo control de ratas sanas recibió en todo momento un tratamiento similar a las enfermas. Los animales fueron sacrificados en el día 6 para la extracción de las articulaciones.

A continuación, se describe en detalle el esquema de las inyecciones intraarticulares que recibió cada grupo (**figura 20**):

- *Grupo Sano*: ninguna de las articulaciones recibió inyección intraarticular.
- *Grupo LPS*: la articulación izquierda se inyectó con 10 µg de LPS (Sigma; 1 µg/µl resuspendido en agua), en un volumen final de 30 µl de PBS con BSA al 0.1%;

mientras que la articulación derecha (contralateral) se inyectó con el mismo volumen de vehículo.

- *Grupo OLI*: la articulación izquierda fue inyectada con 20 µg de OLI [Sigma; 50 µg/µl resuspendidos en dimetil sulfóxido (DMSO)], en un volumen final de 30 µl de PBS con BSA al 0.1%; mientras que la articulación contralateral se inyectó con el mismo volumen de vehículo.

De esta manera la articulación contralateral del propio animal actuó como control de los diferentes estímulos inyectados.

La evolución inflamatoria del daño articular fue evaluada por dos observadores independientes en los días 0, 2, y 5 en el momento previo a la inyección intraarticular y en el día del sacrificio, estimando el diámetro de las articulaciones con un calibre digital (*Silvac*, Qualites, Barcelona, España). También se determinó el peso del animal. Para realizar estos análisis, las ratas se anestesiaron con Sevoflurane™ (al 8% para la inducción y 3% para el mantenimiento; AbbVie Farmacéutica S.L.U., Madrid, España).

1.2. Sacrificio y obtención y procesado de muestras

Antes del sacrificio de las ratas y con ellas anestesiadas, se cateterizó la vena cava y se extrajeron 2 ml de sangre en dos tubos VenoSafe™ (Terumo Europa, Leuven, Bélgica). El primero con anticoagulante EDTA para los estudios de hematología, y el segundo sin anticoagulante para los estudios serológicos. A continuación, los animales se sacrificaron tras la inyección de 2 ml de cloruro potásico (1 mEq/ml), provocándoles de esta forma un paro cardíaco.

Inmediatamente después del sacrificio, se extrajeron las articulaciones traseras de los animales seccionando la articulación a la altura del fémur, aproximadamente un centímetro por encima de la misma. Se eliminaron las partes blandas (piel, musculatura y ligamentos) y la articulación se procesó completa, incluyéndose en formol al 4% (Panreac, Barcelona, España), para el desarrollo de los estudios histológicos. O bien, se abrió la cápsula articular dejando al descubierto el cartílago de los cóndilos femorales y platillos tibiales, que se extrajo en láminas empleándose directamente, o congelándose en nitrógeno líquido para su posterior utilización en los estudios de biología molecular. Por otra parte, el tejido sinovial se incluyó en medio de congelación OCT™ (Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Holanda) y se congeló en nitrógeno líquido para ser empleada posteriormente en los estudios histológicos.

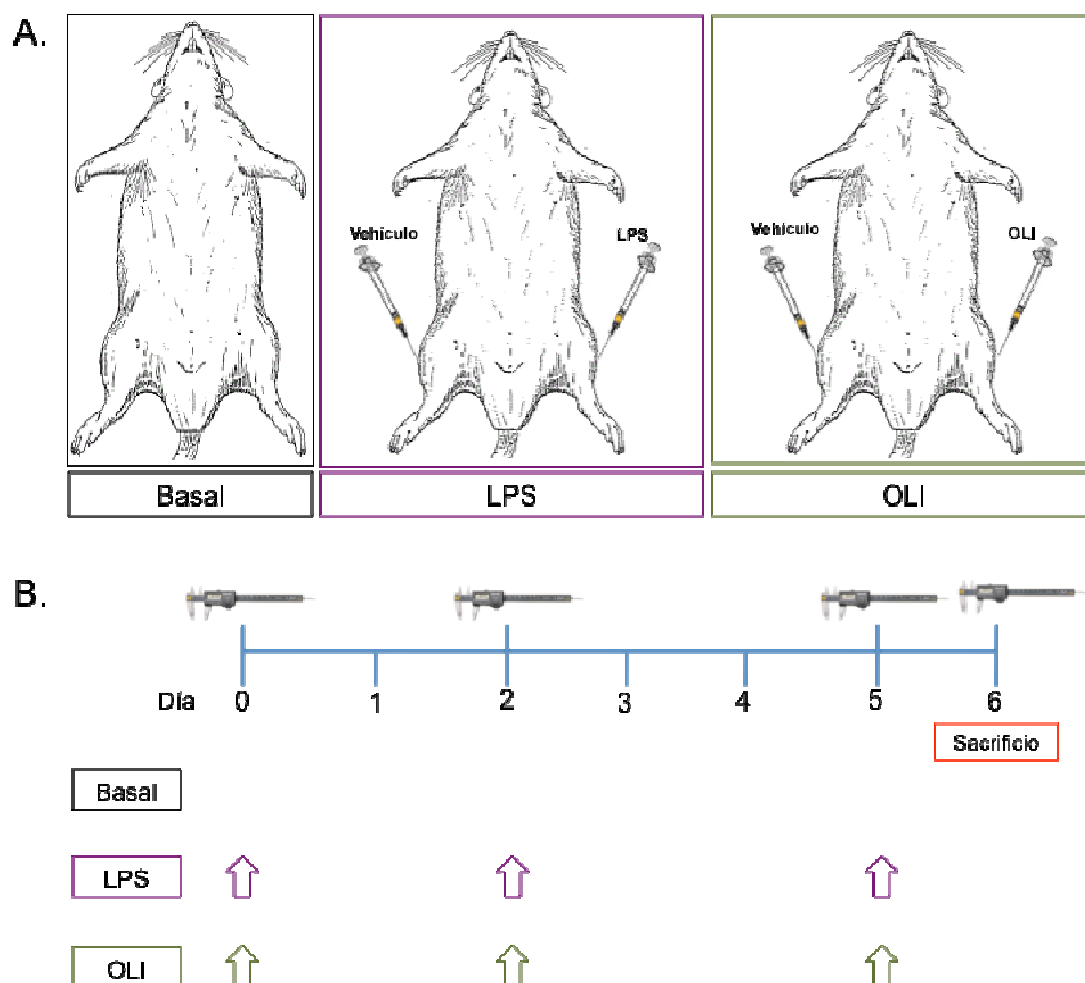


Figura 20: Esquema del desarrollo del modelo animal de daño articular. **A.** Los animales se dividieron en 3 grupos experimentales: Sanos (sin inyección intraarticular); LPS (la articulación izquierda se inyectó con LPS; y su rodilla contralateral con el vehículo); y OLI (la articulación izquierda se inyectó con OLI; y su rodilla contralateral con el vehículo). **B.** El modelo tuvo una duración de 6 días. En los días 0, 2, 5 y 6, las ratas se anestesiaron y el diámetro de sus articulaciones traseras se midió con un calibre digital. Los animales que pertenecían a los grupos experimentales LPS y OLI recibieron en los días marcados con flecha la correspondiente inyección intraarticular en sus articulaciones.

2. VALORACIÓN MACROSCÓPICA DEL DAÑO ARTICULAR

En los días 0, 2, 5 (previamente a la inyección articular) y 6 (sacrificio), se midió en todos los animales el diámetro de las articulaciones traseras. Dos observadores distintos, y constantes a lo largo del modelo, realizaron un total de 10 medidas por articulación y día. Con la media aritmética del valor obtenido en cada articulación, se calculó el incremento individual diario, definido por la resta del grosor de la articulación en el día x menos el valor de la misma articulación en el día del comienzo del modelo.

Finalmente, se compararon los incrementos individuales diarios de las articulaciones inyectadas con LPS u OLI, frente a los obtenidos en las respectivas articulaciones control (contralaterales).

Además, retirada la piel que recubre la articulación, pero con esta cerrada, se analizó en el día del sacrificio la posible existencia de engrosamiento en el tejido sinovial, hematomas o cualquier otro evento destacable.

3. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

3.1. Procesado histológico de las muestras en parafina

El procesado histológico de las articulaciones comenzó con la fijación de las mismas, al introducirlas durante 24 h en un recipiente con ± 20 veces el volumen de la pieza en formol al 4% (Panreac). A continuación, se lavaron con etanol 70°, y se descalcificaron durante 24 h empleando el descalcificador comercial Shandon TBD-1 (Thermo Scientific), que contiene como principio activo ácido clorhídrico al 14%, en una relación volumétrica 1:20. Finalizado este proceso, y tras un lavado de 10 min con etanol 70°, se realizó el tallado de la pieza. Usando el ligamento colateral como referencia y de acuerdo al plano frontal, la articulación se dividió en dos mitades (**figura 21**). Finalmente, se introdujeron en etanol 70° hasta el momento de su inclusión en parafina en el inclusor Myr (Leica), siguiendo un programa comercial específico (**tabla 10**).

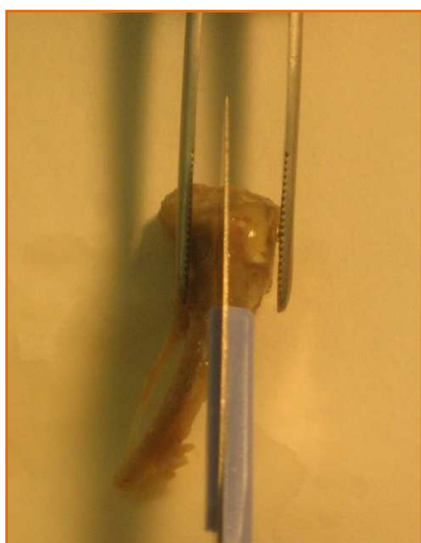


Figura 21: Corte frontal de una articulación trasera de rata

Tabla 10: Programa del inclusor Myr		
REACTIVOS	TIEMPOS (HH:MM)	AGITACIÓN (0 / 1 / 2)
OH-70°	1 h	1
OH-96°	1 h 30 min	1
OH-96°	1 h 30 min	1
OH-100°	1 h	1
OH-100°	1 h 30 min	1
OH-100°	1 h 30 min	1
XIOL	1 h	1
XIOL	1 h	1
XIOL	1 h	1
PARAFINA	3 h	1
PARAFINA	3 h	1

Tabla 10: Detalle del programa utilizado en la inclusión en parafina de las articulaciones.

Por último, el bloque de tejido incluido en parafina se seccionó en cortes de 4 μ m de grosor en un microtomo (Leica RM2155; Leica Biosystems). Los cortes resultantes se colocaron en portaobjetos pretratados (*Superfrost plus*; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EEUU), y se almacenaron durante una semana en una estufa a 37°C, consiguiendo así el secado y fijación final del tejido. En el momento de su utilización, los cortes se incubaron en estufa a 37°C durante una noche, y al día siguiente se desparafinaron con calor (10 min a 60°C) y tratamiento

con xilol (10 min), y se rehidrataron con un gradiente decreciente de etanol (100°, 96° y 70°) y finalmente agua destilada (10 min cada uno).

3.2. Tinciones Histológicas

3.2.1. Tinciones Histoquímicas

3.2.1.a. Hematoxilina-Eosina (H&E)

Es el método de tinción más común en los estudios histológicos. Esta técnica permite valorar la estructura y morfología general de los tejidos. Para ello, se emplean dos colorantes diferentes: la hematoxilina, que tiñe de azul las estructuras basófilas (núcleo celular); y la eosina, que tiñe de un color rosado las estructuras acidófilas (citoplasma y las fibras de colágeno).

Una vez que los cortes histológicos se desparafinaron y rehidrataron, se sumergieron 5 min en hematoxilina de *Harris* (Panreac) y se lavaron con un flujo de agua corriente hasta obtener el viraje crómico. Finalmente, se realizó una contratinción de 5 min con eosina (Merck) y se deshidrataron con un gradiente creciente de etanol (70°, 96° y 100°), y un baño de xilol. Por último, los portajobjetos se montaron con la resina sintética DePex (VWR).

3.2.1.b. Tricrómico de Masson

Esta tinción se emplea para determinar la presencia de fibras de colágeno en el tejido, componente principal de la matriz extracelular del cartílago. Las tinciones tricrómicas contienen diferentes tipos de colorantes: 1) colorantes nucleares (generalmente, hematoxilina férrica que tiñe los núcleos de un color azul-negruzco); 2) colorantes citoplasmáticos en disolución finamente dispersa (fucsina de *Ponceau* que tiñe de rojo citoplasmas, fibras musculares y eritrocitos); y 3) colorantes del conjuntivo en disolución coloidal (azul de anilina, que tiñe las fibras de colágeno de color azul).

Finalizado el proceso de desparafinado y rehidratado de las muestras, estas se sumergieron en alumbre férrico (Merck, 30 min) y hematoxilina férrica de *Weigert* (Fluka, 10 min) lavándose entre cada paso con un flujo de agua corriente. Una vez aclaradas las muestras, se introdujeron en etanol-ácido pícrico (Panreac, 6 min), seguidas de otro lavado con agua corriente (5 min) y pases consecutivos en fucsina de *Ponceau* (Merck, 8 min), en ácido fosfomolibdico (Merck, 5 min), y en azul de anilina (Merck, 12 min). Finalmente, las secciones se aclararon en agua destilada, se deshidrataron y se montaron en DePex (VWR).

3.2.1.c. Safranina O – Verde luz

La Safranina O es un colorante catiónico que está indicado para determinar la presencia de glucosaminos sulfatados (tales como el condroitín y el queratán sulfato, dos de los principales glucosaminoglicanos del cartílago). Por ello, esta tinción se realiza para valorar la pérdida de proteoglicanos, ya que la intensidad de tinción con Safranina O es directamente proporcional al

contenido de los mismos. Sin embargo, cuando el contenido de proteoglicanos es bajo, esta relación deja de ser estequiométrica (Hyllested et al., 2002). Por otra parte, el verde luz tiene mayor afinidad por las moléculas de colágeno I, por lo que la presencia de zonas de cartílago teñidas con este colorante indica que hay una pérdida de matriz y un intento fallido de reparación de esta.

Los cortes histológicos se desparafrinaron y se rehidrataron como se describió previamente. A continuación, los cortes se sumergieron en Safranina O (Sigma, 30 min), se lavaron en agua destilada y se les realizó 4 inmersiones rápidas en verde luz (Fluka). Finalmente, los cortes se deshidrataron y se montaron con DePex (VWR).

Las fotos de las tinciones histoquímicas se realizaron en un microscopio Olympus BX61 (Olympus Biosystem) con la cámara digital DC100 Leica (Leica Microsystems) acoplada a este mismo.

3.2.2. Tinciones Inmunohistoquímicas

Mediante esta técnica se analizó la expresión de la quimioquina IL-8 en las articulaciones traseras de las ratas. Los cortes histológicos obtenidos de estas articulaciones se desparafrinaron y se rehidrataron según se describió previamente. A continuación, y para desenmascarar el antígeno, las muestras se sometieron a un pretratamiento térmico en una olla a presión con tampón citrato pH 6.1 (Dako). Los cortes se dejaron enfriar, se lavaron en agua destilada, y finalmente se trataron con un inhibidor de peroxidasa endógena (Dako, 10 min). Finalizado el tratamiento, y tras un lavado en tampón de lavado PBS (1X, pH 7.6, 0.1% Tween 20), las preparaciones se incubaron durante 1 h con el anticuerpo primario policlonal de conejo frente a IL-8 (Abcam; dilución 1:150). Finalizada esta incubación, se eliminó el exceso de anticuerpo no unido mediante 3 lavados de 5 min, y a continuación se realizó una nueva incubación de 30 min con un anticuerpo secundario policlonal (Dako). Este anticuerpo estaba conjugado con peroxidasa. Por ello, tras 3 nuevos lavados para eliminar su exceso, se añadió el cromógeno DAB (Dako). Este compuesto actúa de sustrato de la peroxidasa, rindiendo un producto de color marrón que actúa como indicador de la cantidad de anticuerpo unido, y por tanto de la cantidad de proteína en el tejido. La reacción enzimática se frenó con agua destilada transcurridos 3 min. Finalmente, y para localizar las reacciones proteína-anticuerpo dentro del contexto celular y tisular, se realizó una contratinción de las preparaciones con hematoxilina de Gill III (Merck, 2 min). Por último, las preparaciones se aclararon, se deshidrataron y se montaron con DePex (VWR).

Para poder cuantificar la señal detectada por esta técnica, se empleó el programa informático *AnalySIS^D* (Olympus). Para este análisis se utilizaron 5 fotografías representativas realizadas a una magnificación de 200X de cada corte histológico. Brevemente, se cuantificó el porcentaje de tejido que presentaba señal positiva (en marrón), y por tanto expresión de IL-8, en relación al área total del tejido evaluado.

3.3. Análisis semi-cuantitativos de grado de daño articular

3.3.1. Determinación del grado de daño en el cartílago

A partir de las tinciones Hematoxilina-Eosina, Tricrómico de Masson y Safranina O-Verde luz, se realizó un análisis semi-cuantitativo del daño producido en el cartílago articular por las diferentes condiciones experimentales. El análisis empleado se extrajo de Pascual Garrido et al. (2009), a partir de una modificación del elaborado inicialmente por Mankin et al. (1971). Esta valoración histológica se dividió en 3 categorías diferentes: estructura del tejido, anormalidades celulares y tinción de la matriz (**tabla 11**).

Tabla 11: Análisis semi-cuantitativo del daño en el cartílago	
I. Estructura	Puntos
Normal	0
Capa superficial interrumpida	1
Capa superficial ausente	2
Superficie irregular	3
Fisuras dentro de la zona media	4
Ligera desorganización	5
Fisuras dentro de la zona profunda	6
Desorganización caótica	7
II. Anormalidades celulares	
Normal	0
Hipocelularidad	1
Presencia de grandes clústeres hipertróficos	2
III. Tinción de la matriz (Safranina O-Verde luz)	
Normal	0
Tinción reducida en la capa media	1
Tinción reducida en matriz territorial de la capa media o profunda	2
Tinción presente en la matriz interterritorial y reducida en la territorial	3
Tinción reducida en la matriz tanto territorial como interterritorial	4
Puntuación máxima	13

Tabla 11: Análisis semi-cuantitativo del grado de daño en el cartílago según escala modificada de Mankin.

3.3.2. Determinación del grado de daño sinovial

Con la ayuda de las tinciones convencionales Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Masson, se estableció un análisis semi-cuantitativo del grado de daño presente en el tejido sinovial. Este análisis se basó en el número de capas que formaban la íntima, la proliferación tisular de la subíntima, la presencia de células inflamatorias, y finalmente la formación de un *pannus* invasivo (ver **tabla 12** y **figura 22**).

Tabla 12: Análisis semi-cuantitativo del daño sinovial

Características/Criterios	Puntos
Sin cambios evidentes (la íntima está formada por 1-2 capas de células sinoviales)	0
Aumento del número de capas de células que forman la íntima ($\geq 3-4$ capas) y/o una ligera presencia de células inflamatorias/proliferación tisular en la subíntima.	1
Incremento del número de capas celulares que forman la íntima ($\geq 3-4$ capas), moderada presencia de células inflamatorias y proliferación tisular en la subíntima.	2
Incremento del número de capas celulares que forman la íntima (> 4 capas), marcada presencia de células inflamatorias y proliferación tisular en la subíntima.	3
Incremento del número de capas celulares que forman la íntima (> 4 capas), severa presencia de células inflamatorias, proliferación tisular en la subíntima y formación de un <i>pannus</i> invasivo.	4

Tabla 12: Análisis semi-cuantitativo del grado de daño sinovial según escala modificada de Gerwin et al., 2010.

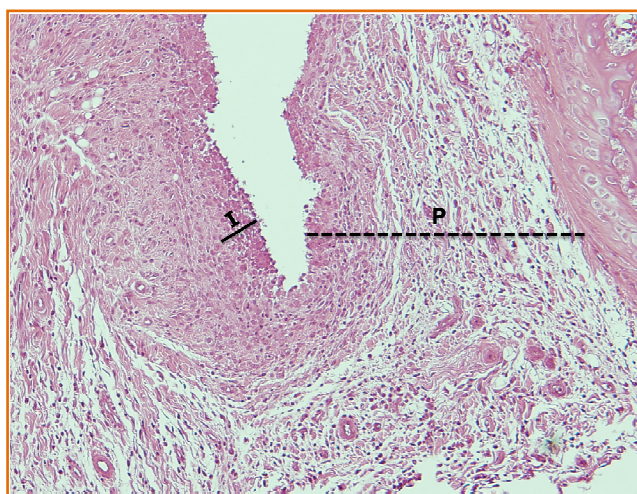


Figura 22: Tinción con Hematoxilina-Eosina de tejido sinovial patológico. Se observa un incremento en la capa de células que forman la íntima (I), una proliferación tisular (P) y una alta presencia de células inflamatorias.

3.3.3. Cuantificación de células PMN en el infiltrado sinovial

El infiltrado de PMN en el tejido sinovial se evaluó con la tinción convencional Hematoxilina-Eosina. Para ello, se realizó un recuento del número de células totales y PMN presentes en 3 regiones diferentes del infiltrado sinovial de $50000 \mu\text{m}^2$ de área cada una. Se realizó un análisis ciego por dos observadores. Los datos expresan el porcentaje de células PMN en relación con el número total de células presentes en un área de $50000 \mu\text{m}^2$ de infiltrado sinovial (figura 23).

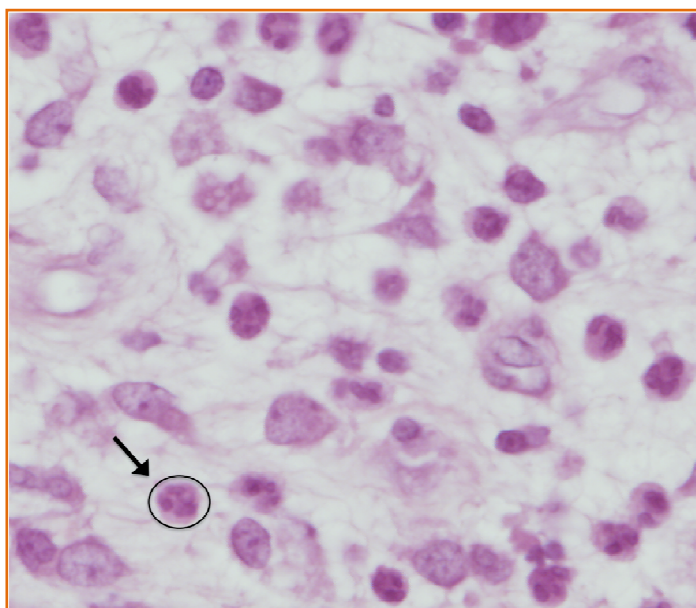


Figura 23: *Imagen representativa de la presencia de infiltrado en tejido sinovial en un corte histológico teñido con Hematoxilina-Eosina. Rodeado por un círculo una de las células PMN presentes en la imagen (aumento a 400X).*

3.4. Cuantificación de la producción de ROS

Mediante el uso de dihidroetidio (DHE; Invitrogen) se determinó la presencia del radical oxidativo superóxido en el tejido sinovial. Esta técnica se fundamenta en que este compuesto al reaccionar con el superóxido produce un fluoróforo que emite luz roja, que se puede detectar en un microscopio de fluorescencia, y que es proporcional a la cantidad de radical presente en la muestra.

Para este estudio, se emplearon secciones de tejido sinovial recién extraídas de los animales procedentes de los diferentes grupos experimentales. Estos pequeños trozos de tejido se depositaron en una placa de 12 pocillos y se incubaron con DHE 10 μM disuelto en medio de cultivo *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS; Gibco) durante 30 min. Terminado el tiempo de incubación, las muestras se congelaron en nitrógeno líquido en medio de congelación OCT™ (Sakura Finetek Europe). A partir de los bloques formados se realizaron cortes de 4 μm de grosor que se depositaron sobre un portaobjetos Superfrust plus (Thermo Fisher Scientific Inc). Posteriormente, las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% (Sigma), y se tiñeron los núcleos con el fluoróforo DAPI como ya se describió anteriormente.

Con el microscopio de fluorescencia Olympus BX61 (Olympus Biosystem) y la cámara digital DC100 Leica (Leica Microsystems) acoplado a ella, se visualizó y fotografió la señal de fluorescencia para ambos fluoróforos, emisión roja para DHE y azul para DAPI. Finalmente, la cantidad de superóxido presente en cada muestra se normalizó tras dividir en cada fotografía el número de píxeles positivos para DHE entre el número obtenido para DAPI.

4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

4.1. Estudios de expresión génica

Para evaluar la expresión de una serie de mediadores inflamatorios en el cartílago articular, se realizaron estudios de expresión génica mediante PCR a tiempo real.

4.1.1. Extracción y cuantificación del ARN

Láminas de cartílago procedentes de la articulación de dos ratas del mismo grupo experimental se agruparon para obtener cantidad suficiente de tejido. Tras su congelación en nitrógeno líquido se pulverizaron en el microdesmembrador Retsch (Verder Group, Utrecht, Holanda) con la ayuda de unas bolas de óxido de circonio de 5 mm de diametro. El ARN de este tejido pulverizado se extrajo empleando Trizol LS (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de la muestra se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, USA) midiendo su absorbancia a 260 nm. La pureza del ARN se calculó el ratio de absorbancia 260/280 nm.

4.1.2. Retro-transcripción del ARNm

Una vez cuantificado el ARN, se ajustó siempre que fue posible la concentración de las muestras a 500 ng/μl. A continuación, y con el fin de eliminar posibles impurezas de ADN antes de realizar el ensayo de retro-transcripción, se trató 1 μg del ARN con 1 μl de desoxirribonucleasa I 1U/μl como se describió previamente.

Para realizar la retrotranscripción se utilizó el kit comercial Superscript[®] VILO[™] MasterMix (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello, se tomaron 8 μl de la solución de ARN resultante y se le añadió 2 μl de MasterMix. La síntesis de ADNc se realizó con cebadores aleatorios mediante un ciclo de 60 min a 42°C. Finalmente, se inactivó la enzima calentándola 5 min a 85°C, y se detuvo la reacción enfriando la muestra a 4°C. Las muestras se congelaron a -20°C hasta el momento de realizar los ensayos de PCR a tiempo real.

4.1.3. Cuantificación de la expresión génica mediante PCR a tiempo real

Una vez obtenido el ADNc se desarrollaron las reacciones de PCR por duplicado en placas de 96 pocillos de fondo en V (Roche). El ensayo se llevo a cabo con el kit comercial *LightCycler 480 SYBR Green I Master* (Roche) y el aparato *LightCycler 480* (Roche) según se describió previamente. En la **tabla 13** se indican los cebadores empleados y la concentración óptima establecida para los genes de estudio: quimioatrayente de neutrófilos inducido por citoquina 1 (CINC-1), ligando de quimioquina C-C 2 (CCL-2), IL-1β, TNF-α, e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT). El programa empleado en el termociclador para la obtención de los distintos productos de amplificación fue el mismo que el descrito previamente

para el ARN extraído de células en cultivo. Los resultados de cada experimento fueron analizados mediante el programa informático *Relative Expression Software Tool*, normalizados en base a un gen de referencia y reflejados como la expresión génica relativa bajo el efecto de una condición determinada frente a la condición control. El gen de referencia empleado fue HPRT, un gen cuya expresión era similar a la de los genes de estudio, y no se encontraba alterada bajo las diferentes condiciones experimentales.

Tabla 13: Lista de cebadores				
Gen	Cebador directo 5'→3'	Cebador reverso 5'→3'	Amplificación (nt)	Concentración empleada
CINC-1	cacactccaacagagcacca	tgacagcgcagctcattg	120	0.4 μM cada cebador
CCL-2	agcatccacgtgctgtctc	gatcatcttgccagtgaatgag	78	0.15 μM cada cebador
IL-1β	agtctgcacagtccccaac	aactatgtcccagaccattgc	92	0.3 μM cada cebador
TNF-α	gccagaccctcacactc	ccactccagctgctcctct	99	0.3 μM cada cebador
HPRT	gaccggttctgtcatgtcg	acctggttcacatcataatcac	61	0.4 μM cada cebador

Tabla 13: Lista de cebadores empleados para la obtención de los productos de amplificación de interés. Para el diseño de los cebadores se utilizó la herramienta informática *Universal Probe Library Tool* disponible en la página web de roche (<http://www.roche-applied-science.com>).

4.2. Estudios de expresión proteica

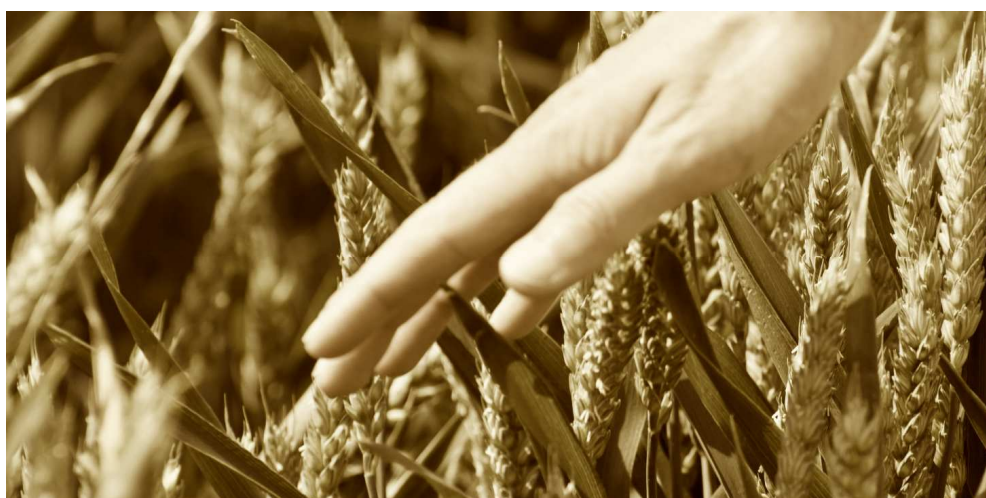
Además de los estudios de inmunohistoquímica previamente descritos, la expresión proteica en el cartílago se valoró mediante ELISA.

Estos estudios se realizaron en explantes de cartílago extraídos de articulaciones de rata. Para obtener una cantidad suficiente de tejido, las láminas de cartílago obtenidas por cada dos ratas del mismo grupo experimental se agruparon. A continuación, el tejido se depositó en tubos con fondo en V y se incubó en DMEM 0% durante 24 h a 37°C en estufa humidificada con 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la producción de CINC-1 mediante ELISA.

Para estas determinaciones se empleó un kit comercial de ELISA (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se empleó una placa de 96 con un anticuerpo frente CINC-1 recubriendo el fondo de pocillos. Posteriormente, se añadieron en los pocillos los sobrenadantes a evaluar. La cantidad de proteína unida al anticuerpo se determinó mediante el sistema biotina-estreptavidina y la reacción colorimétrica peroxidasa-sustrato. La sensibilidad del ELISA es de 1.3 pg/pocillo, y el rango de trabajo entre 7.8-500 pg de CINC-1/pocillo. Los resultados se expresaron en pg de CINC-1, en relación con los valores obtenidos a partir de la curva estándar. Para normalizar la cantidad de quimioquina liberada por cada muestra, se dividió el resultado en pg de CINC-1 obtenido por la cantidad en mg de ADN total en el tejido.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron en las unidades correspondientes como la media \pm el error estándar (EE), o como la media del porcentaje de variación \pm EE respecto al control. Las muestras se estudiaron individualmente o en duplicado, y en ningún caso, salvo cuando se indica, se agruparon para realizar los distintos estudios. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad PRISM versión 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EEUU), aplicando el análisis de varianza ANOVA de una cola y el test de Friedman. Cuando se quisieron realizar comparaciones entre grupos empleamos el test pareado de Wilcoxon. Las diferencias se consideraron significativas estadísticamente cuando la P fue menor o igual a 0.05.



IV. RESULTADOS

Imagen obtenida de <http://www.publicdomainpictures.net/view-image.php?image=46996&picture=mano-en-el-grano&large=1>

A. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DISFUNCIÓN DE LA CRM EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR CITOQUINAS EN EL CONDROCITO ARTICULAR HUMANO *IN VITRO*

Diversos estudios *ex vivo* e *in vitro* han demostrado que los condrocitos humanos artrósicos tienen alterada la función mitocondrial (Blanco et al., 2011; Kim et al., 2010). En particular, nuestro laboratorio ha descrito que los condrocitos procedentes del cartílago con OA presentan un descenso en la actividad enzimática de los complejos I, II y III, en relación con la de los condrocitos extraídos de pacientes sin patología articular (Maneiro et al., 2003). Esta disfunción mitocondrial puede afectar a algunas de las vías patológicas implicadas en la degradación del cartílago (característica principal de esta patología), incluyendo la respuesta defectuosa del condrocito al crecimiento y a la biosíntesis de la MEC, la calcificación de la matriz del cartílago y el aumento de la apoptosis en el condrocito; así como, un incremento de la respuesta inflamatoria y destructiva de la MEC. Sin embargo, hasta el momento no ha sido abordado el efecto de la disfunción mitocondrial en el condrocito sobre la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas. En este sentido, las citoquinas IL-1 β y TNF- α son dos de los principales mediadores implicados en el proceso inflamatorio y destructivo del cartílago.

Por todo ello, el objetivo principal de este apartado fue determinar si la disfunción mitocondrial en el condrocito articular humano es capaz de modular *in vitro* la producción de mediadores inflamatorios en presencia de las citoquinas IL-1 β y TNF- α .

1. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN DE LA CRM SOBRE LA EXPRESIÓN DE IL-8 EN CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS

La IL-8 es una quimioquina que desempeña un papel clave en la patología OA (Borzi et al., 2004; Merz et al., 2003). En particular, la inflamación mediada por IL-8 puede promover la degradación del cartílago a través de la síntesis de MMP-3, la hipertrofia del condrocito y la calcificación de la MEC; asimismo, participa en la formación de los agregados celulares o clústeres, característica histológica propia del cartílago articular artrósico.

Para demostrar la hipótesis de que la disfunción mitocondrial podría modular la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas en los condrocitos humanos normales, se evaluó su efecto sobre la expresión de IL-8 inducida por citoquinas. Inicialmente, en este primer bloque, se analizó si la disfunción de la CRM modulaba por sí misma la expresión de IL-8 en condrocitos normales en cultivo.

1.1. Modulación de la expresión génica de IL-8

En primer lugar, se evaluó el efecto de la inhibición de la CRM sobre la expresión del ARNm de IL-8 en condrocitos en cultivo procedentes de individuos sanos. Para ello, y en base a los resultados previos obtenidos por nuestro grupo y otros investigadores (Johnson et al., 2000; Cillero-Pastor et al., 2008; Milner et al., 2007), se emplearon diferentes concentraciones de dos inhibidores de la CRM: antimicina A (AA; inhibidor del complejo III mitocondrial) y oligomicina (OLI; inhibidor del complejo V mitocondrial). Los condrocitos se cultivaron en placas de 6 pocillos a razón de 5×10^5 células/pocillo, y se trataron durante 4 h con diferentes dosis de AA (10, 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$) u OLI (5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$). Como control positivo de la inducción de la expresión de IL-8 se empleó la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β a la concentración de 5 ng/ml.

Como se muestra en la **figura 24**, tanto AA como OLI indujeron un débil pero significativo incremento, dosis-dependiente, en la expresión génica de IL-8; observándose un mayor aumento con el inhibidor del complejo V. En ambos casos, la mayor respuesta se alcanzó con la dosis de 20 $\mu\text{g/ml}$, obteniéndose unos valores de 38.01 ± 21.50 y 174.84 ± 95.83 veces de incremento tras la estimulación con AA u OLI respectivamente, frente a 1 en la condición basal ($n=6$; $p \leq 0.01$). Como era de esperar, el control positivo 5 ng/ml de IL-1 β indujo unos niveles muy superiores, logrando una expresión 3.91×10^4 veces mayor *versus* (vs.) la condición basal=1 ($n=6$; $p \leq 0.001$).

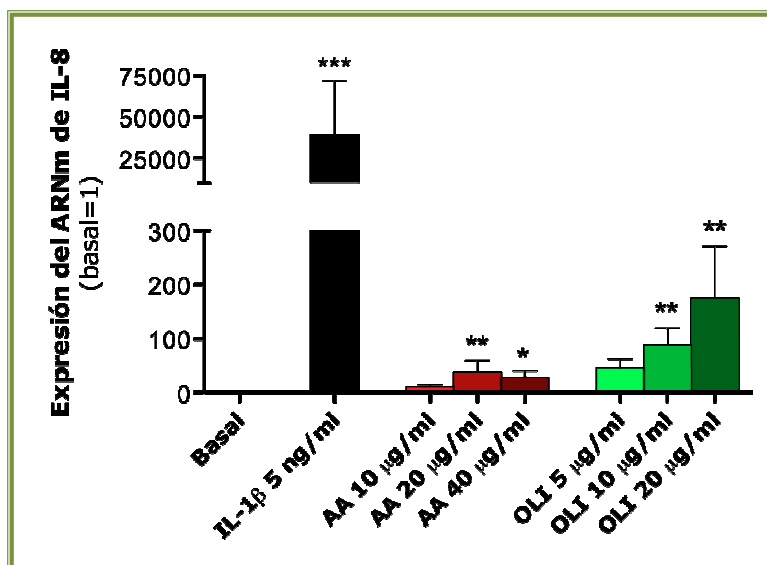


Figura 24: *Expresión del ARNm de IL-8 en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM.* Los condrocitos humanos se cultivaron en placas de 6 pocillos y se incubaron en condiciones basales o con diferentes dosis de AA (10, 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$), OLI (5, 10, y 20 $\mu\text{g/ml}$) o IL-1 β 5 ng/ml durante 4 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se extrajo el ARN y se valoró la expresión de IL-8 mediante ensayos de PCR a tiempo real. La gráfica muestra el ratio de expresión y representa la media \pm EE de 6 experimentos independientes realizados por duplicado (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ vs. basal=1).

1.2. Modulación de la expresión proteica de IL-8

El siguiente paso fue verificar si el incremento en la expresión génica de IL-8 se correlacionaba con un incremento en la expresión proteica. Para ello, los condrocitos se cultivaron en placas de 96 pocillos a razón de 5×10^4 células/pocillo y se estimularon con AA (10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) u OLI (10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) durante 9 y 18 h. Nuevamente, la IL-1 β 5 ng/ml se empleó como control positivo de la expresión de IL-8.

Una vez más, el tratamiento de los condrocitos con AA u OLI aumentó débil, pero significativamente la expresión proteica de IL-8 de forma tiempo- y dosis-dependiente (**figura 25**). Además, se alcanzaron valores significativos con OLI 20 $\mu\text{g/ml}$ a las 9 h, y a las 18 h, para el resto de condiciones testadas. Al igual que ocurría a nivel de ARNm, los mayores incrementos con ambos inhibidores se observaron con la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ a las 18 h, siendo de 163.65 ± 107.34 y 269.91 ± 163.73 pg/ 5×10^4 células tras al tratamiento con AA y OLI, respectivamente, frente a un nivel basal de 1.88 ± 1.76 pg/ 5×10^4 células ($n=6$, $p \leq 0.05$). Al mismo tiempo, el control positivo, IL-1 β , aumentó la liberación de IL-8 hasta $105.16 \times 10^3 \pm 11.21 \times 10^3$ pg/ 5×10^4 células ($n=6$, $p \leq 0.001$).

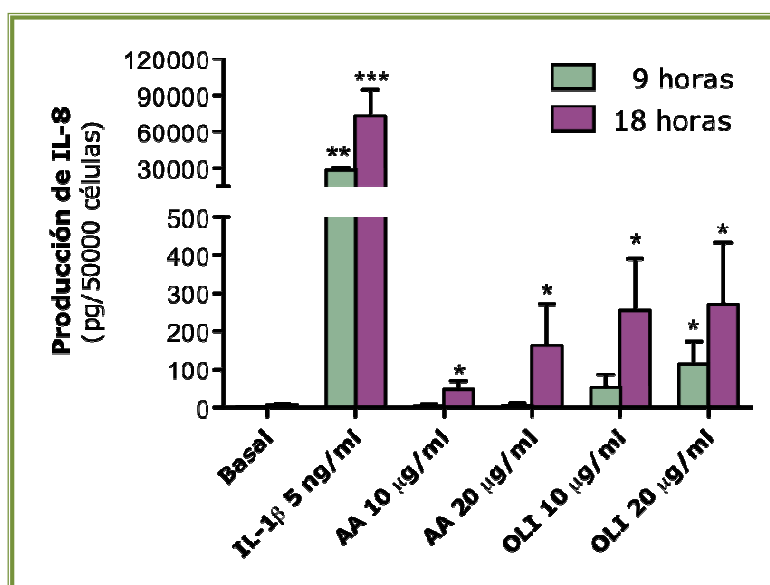


Figura 25: Producción de IL-8 en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Los condrocitos humanos se cultivaron en placas de 96 pocillos en condiciones basales o en presencia de AA (10 y 20 $\mu\text{g/ml}$), OLI (10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) o IL-1 β 5 ng/ml durante 9 o 18 h. Transcurrido este tiempo, se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la producción de IL-8 mediante ELISA. La gráfica muestra la cantidad en pg de IL-8 liberada por 5×10^4 células, y representa la media \pm EE de 6 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ v.s. basal).

1.3. Estudios histológicos de IL-8

En último lugar, se testó si las modulaciones alcanzadas en el cultivo celular se reproducían también a nivel tisular. Para desarrollar esta aproximación, se emplearon explantes de cartílago de donantes normales, se estimularon con OLI 5 $\mu\text{g/ml}$ durante 72 h en placas de 48 pocillos y se cuantificaron los niveles de IL-8 liberados. Como se muestra en la **figura 26**, una vez más, se observó un pequeño pero significativo incremento en la cantidad de quimioquina secretada en presencia de OLI en relación a la condición basal ($n=6$, $p\leq 0.05$).

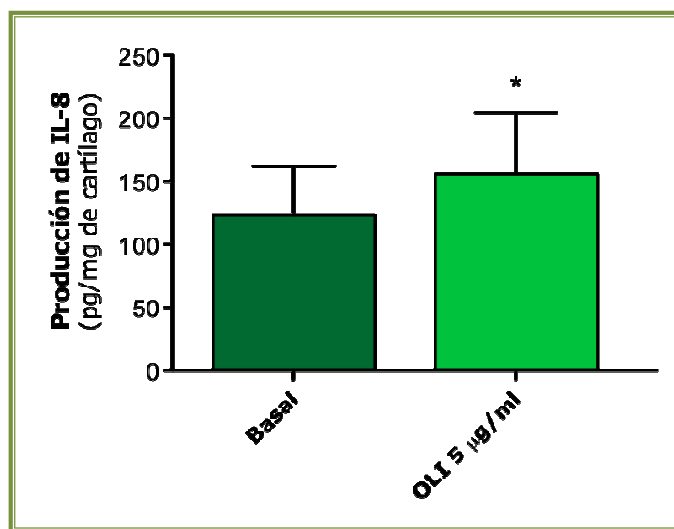


Figura 26: Producción de IL-8 en explantes de cartílago sometidos a la disfunción de la CRM. Los explantes de cartílago humano se cultivaron en placas de 48 pocillos en condiciones basales o con OLI (5 $\mu\text{g/ml}$) durante 72 h. Transcurrido este tiempo, se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la producción de IL-8 mediante ELISA. La gráfica muestra los pg de IL-8 liberados por mg de cartílago y representa la media \pm EE de 6 experimentos independientes (* $p\leq 0.05$ vs. basal).

En su conjunto, los resultados de este primer bloque confirman, como previamente se había demostrado a nivel de COX-2 (Cillero-Pastor et al., 2008), que la alteración de la actividad de la CRM, y en concreto de los complejos III y V, genera una respuesta inflamatoria en condrocitos humanos normales en cultivo.

2. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN DE LA CRM SOBRE LA EXPRESIÓN DE IL-8 INDUCIDA POR IL-1 β

Como ya se mencionó anteriormente, la IL-1 β es una de las principales citoquinas pro-inflamatorias involucradas en el proceso artrósico. Por este motivo, fue uno de los mediadores seleccionados para evaluar si la disfunción mitocondrial en el condrocito articular humano era capaz de modular *in vitro* la respuesta inflamatoria en presencia de citoquinas.

Así pues, en este segundo bloque y después de observar el resultado de la inhibición de la CRM sobre la expresión de IL-8, se investigó el efecto de la disfunción mitocondrial sobre la expresión de IL-8 inducida por IL-1 β .

2.1. Modulación de la expresión génica de IL-8

En primer lugar, se valoró mediante PCR a tiempo real el efecto de AA y OLI sobre la expresión del ARNm de IL-8 inducida por IL-1 β . Para ello, los condrocitos se cultivaron en placas de 6 pocillos a 5×10^4 células/pocillo, se pretrataron durante 1 h con AA (10 μ g/ml) u OLI (10 μ g/ml), y posteriormente fueron estimulados durante 4 h con IL-1 β 1.5 ng/ml.

Como se puede observar en la **figura 27**, la preincubación de los condrocitos con AA u OLI redujo significativamente la concentración umbral de IL-1 β necesaria para inducir un nivel de expresión similar del ARNm de IL-8. Así, el nivel de expresión del ARNm inducido por IL-1 β 1.5 ng/ml, en las células sometidas a disfunción mitocondrial, alcanzó un valor de $245.8 \pm 60.6\%$ y $404.8 \pm 79.0\%$ con AA y OLI, respectivamente, frente al valor de 100% obtenido en las células sin pretratamiento ($n=6$, $p \leq 0.05$ y $p \leq 0.01$ respectivamente). Destacar que el mayor incremento se produjo en los condrocitos tratados con OLI. Al mismo tiempo, el control positivo IL-1 β 5 ng/ml mostró una expresión de $453.6 \pm 199.2\%$ en relación con IL-1 β 1.5 ng/ml.

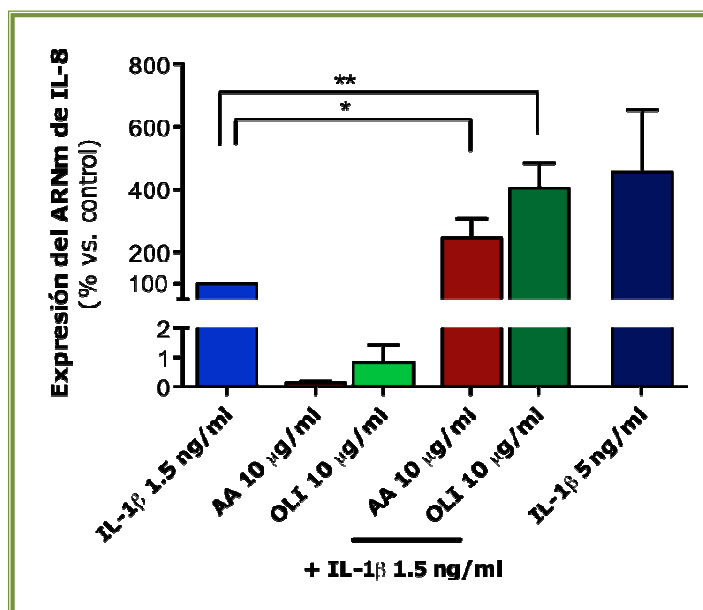


Figura 27: *Expresión del ARNm de IL-8 inducido por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM.* Los condrocitos sembrados en placas de 6 pocillos se preincubaron durante 1 h con AA (10 μ g/ml) u OLI (10 μ g/ml). Posteriormente, las células se estimularon con IL-1 β 1.5 ng/ml durante 4 h. La IL-1 β 5 ng/ml se empleó como control positivo. Transcurrido el tiempo de incubación se extrajo el ARN y se valoró por PCR a tiempo real la expresión de IL-8. La gráfica muestra el ratio de expresión como porcentaje respecto de IL-1 β 1.5 ng/ml (100%) y representa la media \pm EE de 6 experimentos independientes por duplicado (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

2.2. Modulación de la expresión proteica de IL-8

A continuación se comprobó, por diferentes técnicas de análisis proteico, si AA (10 $\mu\text{g/ml}$) u OLI (10 $\mu\text{g/ml}$) amplificaban también la expresión proteica de IL-8 inducida por IL-1 β . En primer lugar, se empleó la técnica de citometría de flujo. Para ello, los condrocitos se cultivaron en placas de 6 pocillos con una densidad de 5×10^5 células/pocillo, se preincubaron durante 1 h con el inhibidor de la CRM correspondiente y a continuación se estimularon con concentraciones crecientes de IL-1 β (0.5, 1.5, 5 ng/ml) durante 8 h. Tras evaluar la señal de fluorescencia de cada población celular, se pudo confirmar que la expresión de IL-8 inducida por IL-1 β incrementó significativamente en aquellos condrocitos previamente tratados con los inhibidores mitocondriales (**figura 28**). Además, esta respuesta fue dosis-dependiente, con un mayor porcentaje de incremento, respecto de la condición sin pretratamiento, con las concentraciones más bajas de la citoquina (0.5 y 1.5 ng/ml). En particular, el porcentaje de incremento con OLI fue de 267%, 261% y 190% con IL-1 β 0.5, 1.5 y 5 respectivamente vs. 100% en las correspondientes condiciones sin OLI ($n=6$; $p \leq 0.01$).

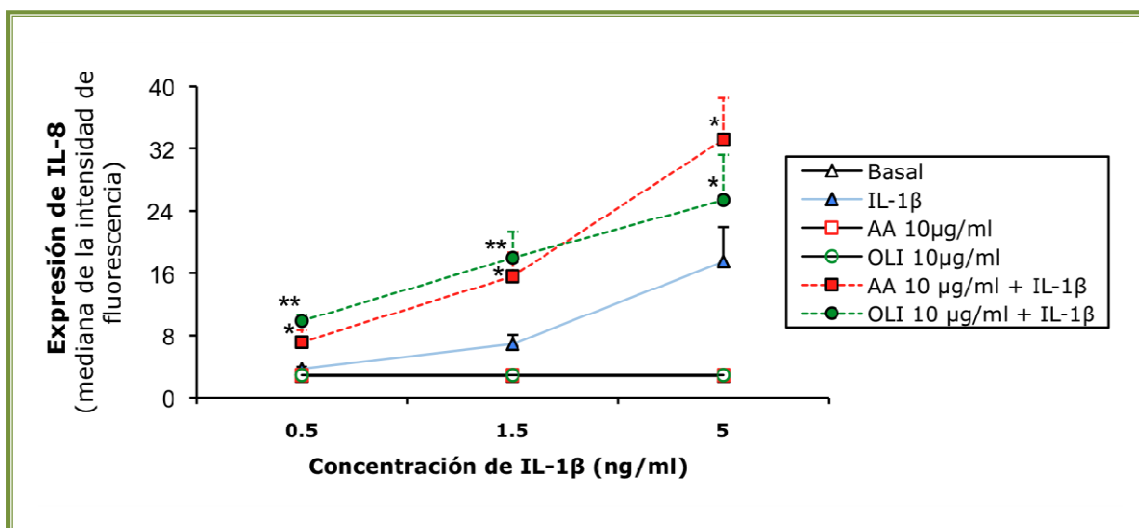


Figura 28: Expresión proteica de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Estudios de dosis-dependencia. Los condrocitos humanos sembrados en placas de 6 pocillos se preincubaron durante 1 h con AA (10 $\mu\text{g/ml}$) u OLI (10 $\mu\text{g/ml}$). A continuación, las células se estimularon con diferentes concentraciones de IL-1 β (0.5, 1.5, 5 ng/ml) durante 8 h. Para evitar la liberación al medio de IL-8, 4 h antes de finalizar el tiempo de incubación se añadió BD GolgiStop (0.7 $\mu\text{l/ml}$). Finalmente, la expresión de IL-8 se valoró por citometría de flujo. La gráfica muestra los datos correspondientes a la mediana de la intensidad de fluorescencia y representan la media \pm EE de 6 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ vs. IL-1 β sola).

En la **figura 29** se puede observar más claramente el efecto sinérgico que la inhibición de la CRM induce sobre la expresión proteica de IL-8 inducida por la dosis 1.5 ng/ml de IL-1 β .

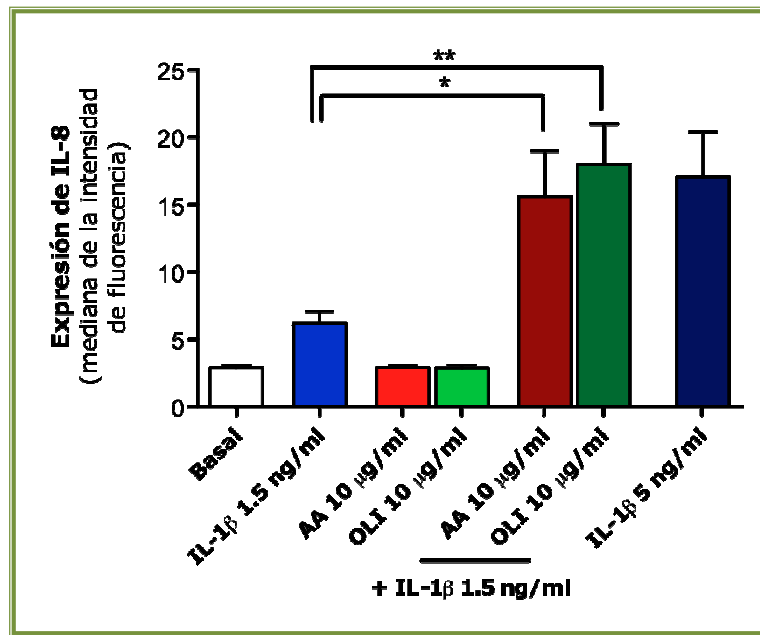


Figura 29: *Expresión proteica de IL-8 inducida por IL-1β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM.* Los condrocitos humanos sembrados en placas de 6 pocillos se preincubaron durante 1 h con AA (10 μg/ml) u OLI (10 μg/ml). A continuación, las células se estimularon con IL-1β 1.5 ng/ml durante 8 h. IL-1β 5 ng/ml fue empleada como control positivo. Para evitar la liberación al medio de IL-8, 4 h antes de finalizar el tiempo de incubación se añadió BD GolgiStop (0.7 μl/ml). Finalmente, la expresión de IL-8 fue valorada por citometría de flujo. La gráfica muestra los datos correspondientes a la mediana de la intensidad de fluorescencia y representa la media ± EE de 8 experimentos independientes (*p≤0.05; **p≤0.01).

Estos resultados se confirmaron mediante estudios de inmunocitoquímica. En esta ocasión, los condrocitos se cultivaron en portaobjetos acoplados a soporte de 8 pocillos con un nivel de confluencia de 2×10^4 células/pocillo y se estimularon de manera análoga a la ya descrita en este bloque. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la fijación de las células y a realizar las incubaciones con los anticuerpos correspondientes según se indica en *Materiales y Métodos*. Como se puede observar en la **figura 30**, en las preparaciones correspondientes a las células pretratadas con OLI y posteriormente estimuladas con IL-1β se encontró un mayor número de células positivas por campo de visión, además de una mayor intensidad de señal (en color marrón) vs. a las que no se había inducido una disfunción mitocondrial previa. Como era esperable, las muestras no incubadas con el anticuerpo (Negativo) no mostraron señal positiva.

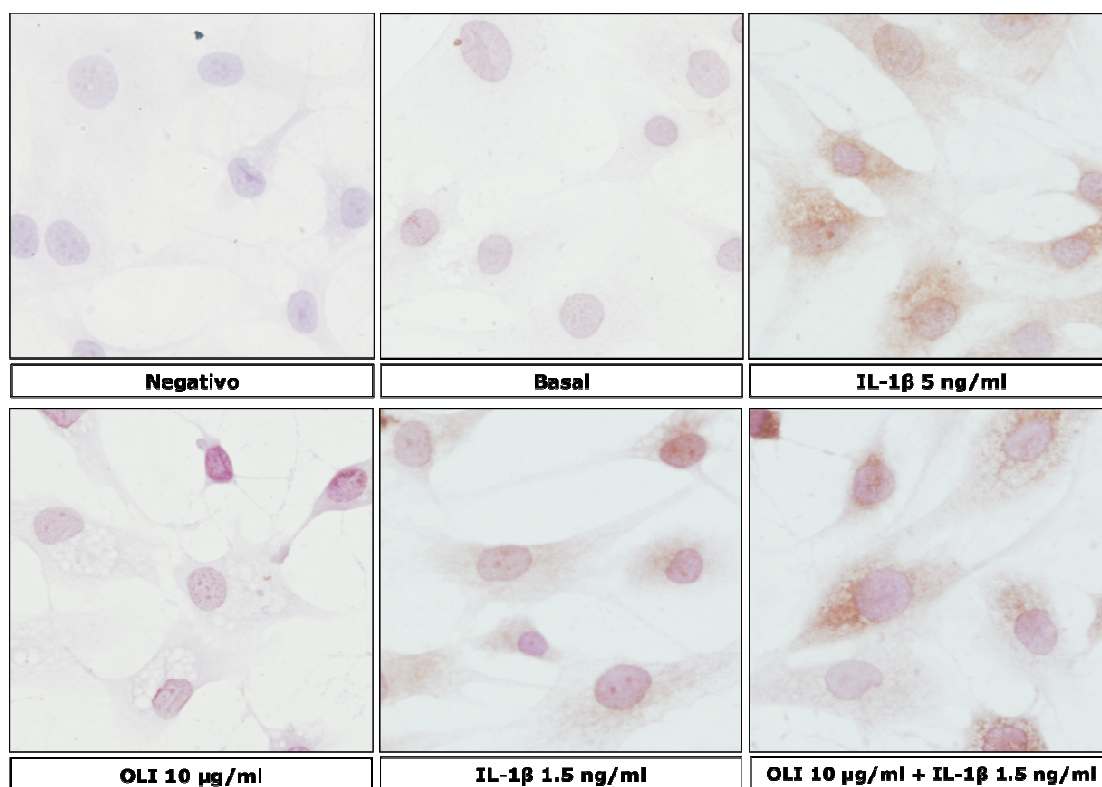


Figura 30: Análisis inmunocitoquímico de la expresión de *IL-8* inducida por *IL-1β* en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Los condrocitos humanos sembrados en portaobjetos acoplados a soporte de 8 pocillos se preincubaron durante 1 h con OLI (10 μ g/ml), a continuación se estimularon 8 h con *IL-1β* 1.5 ng/ml. *IL-1β* 5 ng/ml fue empleada como control positivo. 4 h antes de finalizar el tiempo de incubación se añadió BD GolgiStop (0.7 μ l/ml) para evitar la liberación de *IL-8* al medio. Finalmente, la expresión de *IL-8* se visualizó mediante inmunocitoquímica. El control negativo consistió en la realización de la técnica sin anticuerpo primario. Las imágenes (a 200X aumentos) muestran un experimento representativo (n=3).

De manera similar, cuando la expresión proteica se valoró a 18 h mediante ELISA se obtuvieron resultados paralelos (**figura 31**). Para desarrollar este análisis, los condrocitos sembrados en placas de 96 a 5×10^4 células/pocillo se preincubaron con AA (10 μ g/ml) u OLI (5 μ g/ml), y se estimularon con la dosis más baja de *IL-1β* (0.5 ng/ml) durante 18 h. Los resultados obtenidos confirmaron que en los condrocitos con disfunción de la CRM, la *IL-1β* producía un incremento significativo de los niveles de la quimioquina liberada en relación con los que no habían sido pretratados con los inhibidores de la CRM.

Finalmente, y como refleja la **figura 32**, la producción de *IL-8* generada por *IL-1β* a las 9 h en los condrocitos preincubados con el inhibidor del complejo V (6530 ± 2136 pg/ 5×10^4 células) fue equiparable a la obtenida a las 18 h por la misma concentración de la citoquina en los condrocitos sin preincubación con OLI (5931 ± 1995 pg/ 5×10^4 células).

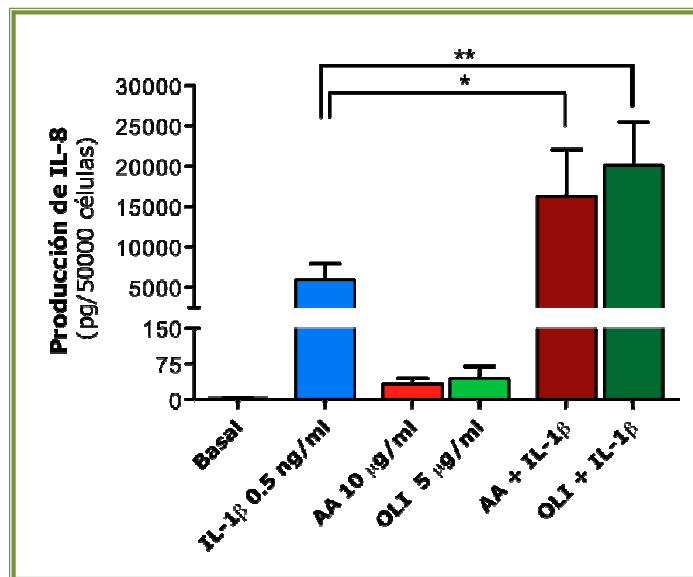


Figura 31: Producción de IL-8 inducida por IL-1β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Los condrocitos humanos sembrados en placas de 96 pocillos se preincubaron durante 1 h con AA (10 μg/ml) u OLI (5 μg/ml). Posteriormente, las células se estimularon 18 h con IL-1β 0.5 ng/ml. La cantidad de IL-8 presente en los sobrenadantes resultantes se valoró mediante ELISA. La gráfica muestra los pg de IL-8 producidos por 5×10^4 células y representan la media \pm EE de 6 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

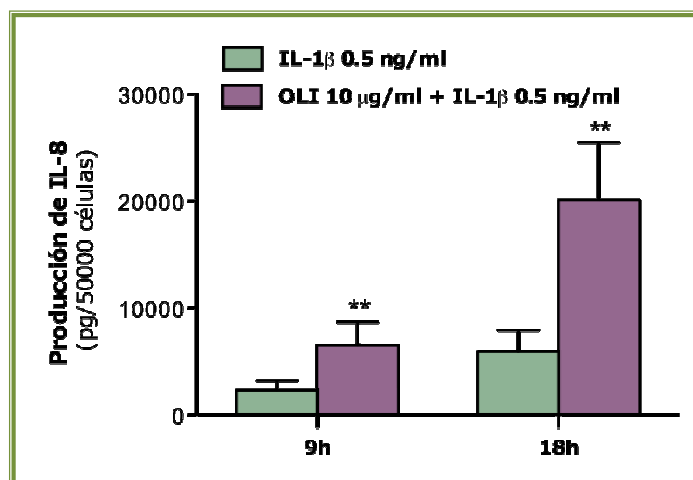


Figura 32: Producción de IL-8 inducida por IL-1β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Estudios tiempo-dependencia. Los condrocitos humanos sembrados en placas de 96 pocillos se preincubaron 1 h con OLI (5 μg/ml), y a continuación se estimularon con IL-1β 0.5 ng/ml durante 9 y 18 h, respectivamente. Finalizado el tiempo de incubación, se cuantificó la producción de IL-8 mediante ELISA. La gráfica muestra los pg de IL-8 producidos por 5×10^4 células y representa la media \pm EE de 6 experimentos independientes (** $p \leq 0.01$ vs. IL-1β 0.5 ng/ml).

En conclusión, la disfunción mitocondrial aumenta la sensibilidad del condrocito a la IL-1β. De tal forma, que la inhibición de la CRM reduce significativamente la concentración de

IL-1 β necesaria para inducir un nivel de IL-8 similar al inducido por una concentración mayor de la citoquina; o bien, el tiempo de estimulación requerido para inducir un nivel de producción de IL-8 equivalente al inducido por un tiempo superior de estimulación y con la misma concentración de IL-1 β .

2.3. Ensayo de quimiotaxis

Como último apartado de este bloque de experimentos, se realizó un estudio de funcionalidad proteica. En concreto, se evaluó si la IL-8 sintetizada en las condiciones experimentales previamente descritas, era capaz de atraer PMN, principalmente neutrófilos, característica que define a esta quimioquina. Para ello, se realizaron ensayos de quimiotaxis según se indicó en el capítulo de *Materiales y Métodos*.

Se emplearon los sobrenadantes del cultivo de 2.5×10^5 condrocitos estimulados en placas de 12 pocillos durante 18 h de manera análoga a la descrita en este bloque. Como se observa en la **figura 33**, el pretratamiento de los condrocitos con el inhibidor OLI incrementó significativamente la migración de neutrófilos inducida por IL-1 β a través de la membrana del *transwell*, alcanzando valores de 3359 ± 2150 frente a 1377 ± 685 neutrófilos migrados en la condición con IL-1 β sola ($n=6$, $p \leq 0.05$). Además, la especificidad de la actividad biológica de la IL-8 se determinó mediante su inhibición con un anticuerpo específico.

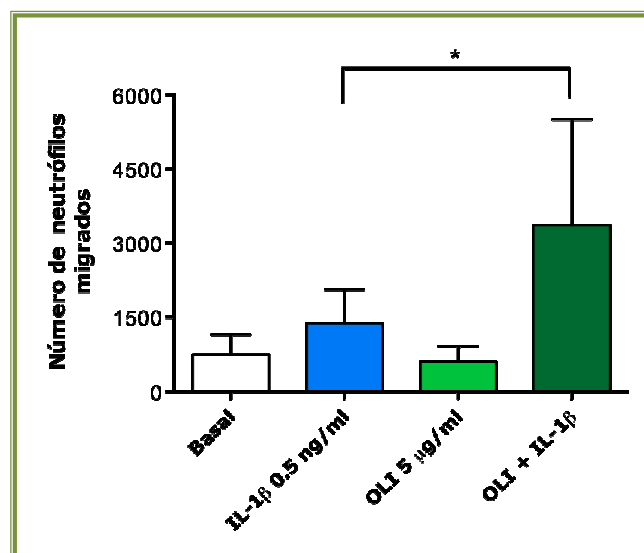


Figura 33: Estudio de quimiotaxis de neutrófilos inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Los condrocitos humanos sembrados en placas de 12 pocillos se preincubaron durante 1 h con OLI (5 μ g/ml). Posteriormente, las células se estimularon con IL-1 β 0.5 ng/ml durante 18 h. El poder quimiotáctico de los sobrenadantes resultantes fue evaluado mediante ensayo transmembrana en placas de 24 pocillos, según se indicó en la sección de *Materiales y Métodos*. La migración de neutrófilos se valoró mediante citometría de flujo. La gráfica muestra el número de neutrófilos migrados y representa la media \pm EE de 6 experimentos independientes por duplicado (* $p \leq 0.05$).

Como era de esperar, la actividad quimiotáctica se redujo en un 48% cuando los sobrenadantes fueron incubados, antes de realizar el ensayo, con 500 ng/ml de anticuerpo anti-IL-8. Validando estos resultados, la actividad biológica de la IL-8 no disminuyó en presencia de una cantidad equivalente de una IgG no relacionada, lo que confirmó la especificidad del anticuerpo (**tabla 14**).

Tabla 14: Neutralización de la actividad quimiotáctica de IL-8	
Estímulo	Neutrófilos migrados (vs. 100% control)
OLI + IL-1 β	100%
Anti-IL-8 + OLI + IL-1 β	51.35 \pm 15.03%

Tabla 14: Neutralización de la actividad quimiotáctica de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Algunos de los sobrenadantes de condrocitos que habían sido preincubados con OLI (5 μ g/ml) y posteriormente con IL-1 β (0.5 ng/ml), se incubaron con 500 ng/ml de anticuerpo anti-IL-8 durante 1 h a 37°C antes de realizar el ensayo de quimiotaxis. Datos obtenidos a partir de 3 experimentos.

3. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2 Y PGE₂ INDUCIDA POR IL-1 β

La elevada expresión génica de la COX-2 y de su producto enzimático, la PGE₂, son unas de las características más relevantes de la respuesta inflamatoria que definen a las enfermedades articulares, como es la OA (Amin et al., 1997). En este sentido, la PGE₂ participa de forma crucial en gran parte de los efectos catabólicos registrados en la enfermedad artrósica (Attur et al., 2008). Asimismo, nuestro grupo ha descrito como la inhibición del complejo III o V de la CRM induce en condrocitos normales en cultivo un ligero pero significativo aumento en la expresión de COX-2 y en la producción de PGE₂ (Cillero-Pastor et al., 2008).

Por ello, el objetivo en este apartado fue determinar si la disfunción mitocondrial podría amplificar también la expresión de COX-2 y PGE₂ inducida por citoquinas en el condrocito.

3.1. Modulación de la expresión génica de COX-2

En primer lugar, se valoraron los niveles de expresión del ARNm de COX-2 mediante PCR a tiempo real. Los condrocitos se sembraron en placas de 6 pocillos a 5×10^4 células/pocillo siguiendo el protocolo ya descrito de estimulación: las células se preincubaron durante 1 h con OLI (10 μ g/ml) y a continuación se estimularon con IL-1 β (1.5 ng/ml) durante 4 h. Como se observa en la **figura 34**, la preincubación con el inhibidor de la CRM incrementó significativamente la expresión génica de COX-2 inducida por IL-1 β (1249 \pm 707.8 OLI + IL-1 β vs. 298.8 \pm 90.3 con IL-1 β sola, siendo considerada la expresión basal=1 (n=10, p \leq 0.05).

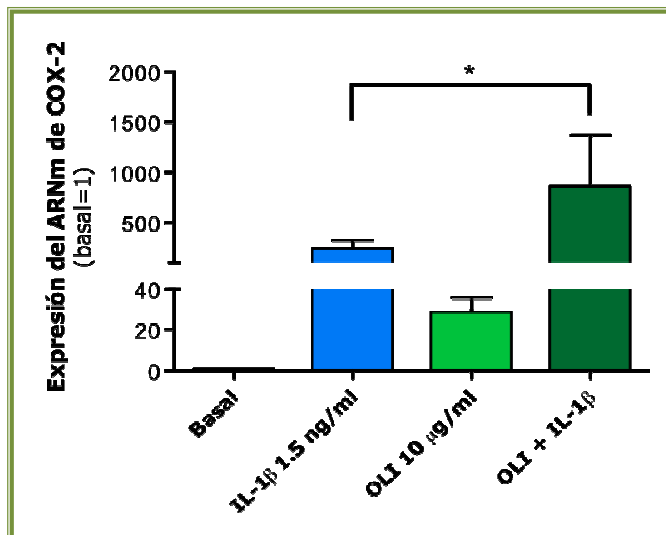


Figura 34: *Expresión del ARNm de COX-2 inducido por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM.* Los condrocitos humanos sembrados en placas de 6 pocillos se preincubaron durante 1 h con OLI (10 μ g/ml) y posteriormente se estimularon con IL-1 β 1.5 ng/ml durante 4 h. Transcurrido el tiempo de incubación se extrajo el ARN y por PCR a tiempo real se valoró la expresión de COX-2. La gráfica muestra el ratio de expresión (basal=1) y representa la media \pm EE de 10 experimentos independientes por duplicado (* $p \leq 0.05$).

3.2. Modulación de la expresión proteica de COX-2

El siguiente paso fue evaluar la expresión proteica de esta enzima. Para ello, se realizó citometría de flujo de doble marcaje que permitió detectar tanto los niveles de expresión de la forma constitutiva de la enzima (COX-1) como la forma inducible de la misma (COX-2). Como se observa en la **figura 35**, se obtuvieron resultados concordantes con los niveles de ARNm (53.47 \pm 7.31 OLI + IL-1 β vs. 14.62 \pm 3.76 con IL-1 β sola, $n=6$, $p \leq 0.05$). Como era de esperar, no se observó modulación en la expresión de la isoforma constitutiva en ninguna de las condiciones evaluadas (**figura 36**).

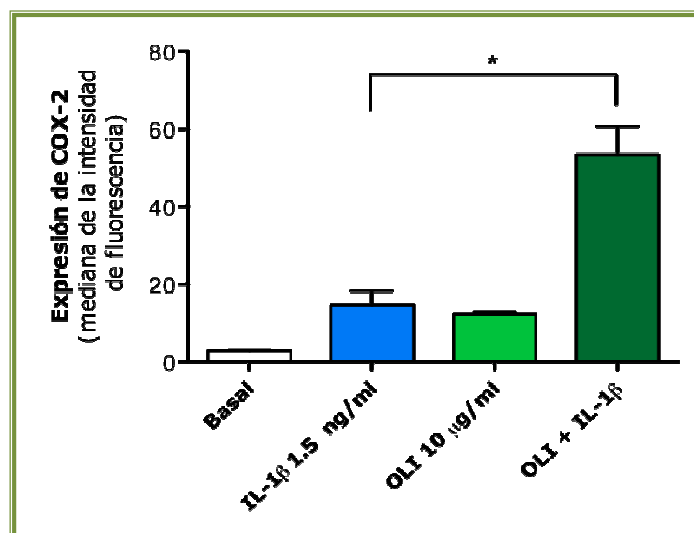


Figura 35: *Expresión proteica de COX-2 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM.* Los condrocitos humanos sembrados en placas de 6 pocillos se preincubaron durante 1 h con OLI (10 μ g/ml) y posteriormente se estimularon con IL-1 β 1.5 ng/ml durante 6 h. A continuación, la expresión de COX-2 se valoró por citometría de flujo. La gráfica muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia y representa la media \pm EE de 6 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$).

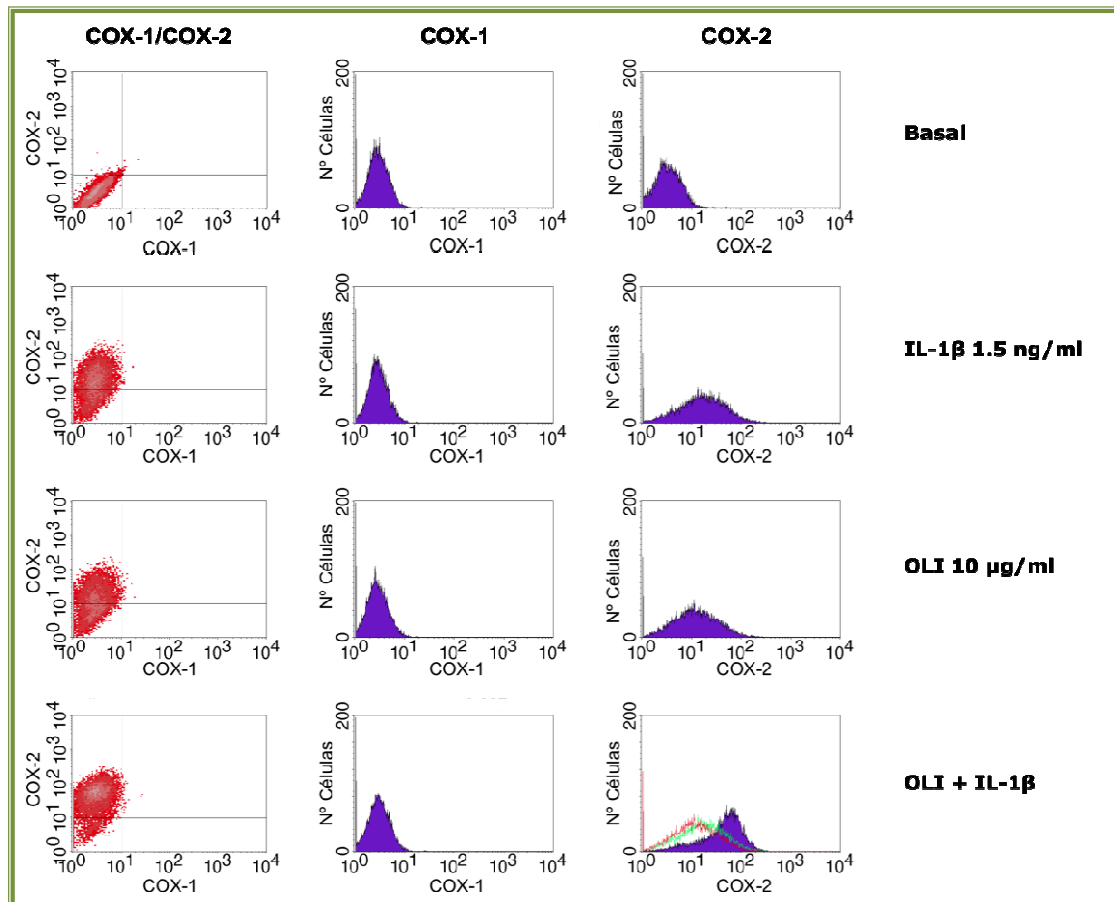


Figura 36: Ejemplo de citometría de flujo mostrando la expresión proteica de COX-1 y COX-2 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. La columna de la derecha representa la relación entre la población celular que expresó COX-1 (eje de abscisas) y la que expresó COX-2 (eje de ordenadas) en cada condición. La columna central e izquierda muestran los histogramas que representan la población celular que expresó COX-1 y COX-2, respectivamente. En el histograma de COX-2 que representa a la condición OLI + IL-1 β , el perfil verde se corresponde con la expresión inducida por IL-1 β y el perfil rojo con la expresión inducida por OLI. Experimento representativo de 6 realizados.

3.3. Modulación de la producción de PGE₂

Como se acaba de describir, la disfunción de la CRM produjo una clara amplificación de la expresión a nivel génico y proteico de la enzima COX-2 inducida por IL-1 β , en condrocitos humanos normales. A continuación, se evaluó si dicho aumento, inducía también un incremento en los niveles de PGE₂, producto final mayoritario de la reacción que cataliza la enzima COX-2. Para ello, se preincubaron condrocitos sembrados en placas de 96 pocillos a razón de 5×10^4 células/pocillo con OLI 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 h, y a continuación se estimularon con IL-1 β 1.5 ng/ml durante 18 h. Una vez más, como se puede examinar en la **figura 37**, los condrocitos pretratados con OLI y posteriormente con IL-1 β presentaron niveles de PGE₂ significativamente mayores que aquellos incubados únicamente con los distintos estímulos por separado. La respuesta observada fue de 653.0 ± 151.2 con OLI + IL-1 β vs. 268.7 ± 132.3 con IL-1 β o 275.8 ± 85.94 pg/ 5×10^4 células con OLI ($n=10$; $p \leq 0.05$).

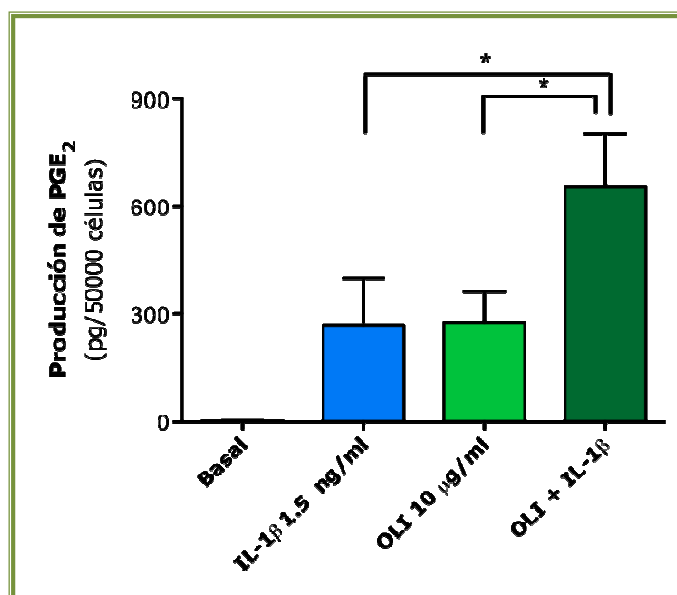


Figura 37: Producción de PGE₂ inducida por IL-1β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Los condrocitos humanos sembrados en placas de 96 pocillos se preincubaron durante 1 h con OLI (10 μg/ml); posteriormente, las células se estimularon con IL-1β 1.5 ng/ml durante 18 h. La cantidad de PGE₂ secretada en los sobrenadantes resultantes se valoró mediante ELISA. La gráfica muestra la cantidad en pg de PGE₂ liberada por 5x10⁴ células y representa la media ± EE de 10 experimentos independientes (*p≤0.05).

De esta forma, estos resultados demuestran que la disfunción mitocondrial potencia de forma sinérgica la acción inflamatoria de IL-1β sobre el condrocito, incrementando la expresión de COX-2 y de su producto enzimático la PGE₂.

4. EFECTO DE LA DISFUNCIÓN DE LA CRM SOBRE EL PÉRFIL INFLAMATORIO INDUCIDO POR TNF-α

Como se ha comentado en la introducción, el TNF-α, junto con la IL-1β, es una de las principales citoquinas ligadas a la destrucción del cartílago articular (Faccini et al., 2005; Mueller y Tuan, 2011). Por ello, el siguiente objetivo que se planteó fue determinar si la disfunción mitocondrial podía intensificar la sensibilidad del condrocito al TNF-α, de la misma manera que lo hacía con IL-1β.

4.1. Modulación de la expresión génica de IL-8

Para abordar este estudio, se valoró en un primer lugar el nivel de expresión del ARNm de IL-8 mediante ensayos de PCR a tiempo real. Como se observa en la **figura 38**, tras 1 h de preincubación con OLI (10 μg/ml) seguida de 4 h de estimulación con TNF-α 5 ng/ml, el nivel

del ARN mensajero de IL-8 inducido por TNF- α se vio incrementado de forma significativa con respecto a la condición no pretratada (128231 ± 68865 OLI + TNF- α vs. 57873 ± 42339 TNF- α solo, siendo considerada la expresión basal=1, $n=7$; $p \leq 0.05$). De tal manera, que se obtuvo una respuesta sinérgica similar a la descrita inicialmente con IL-1 β .

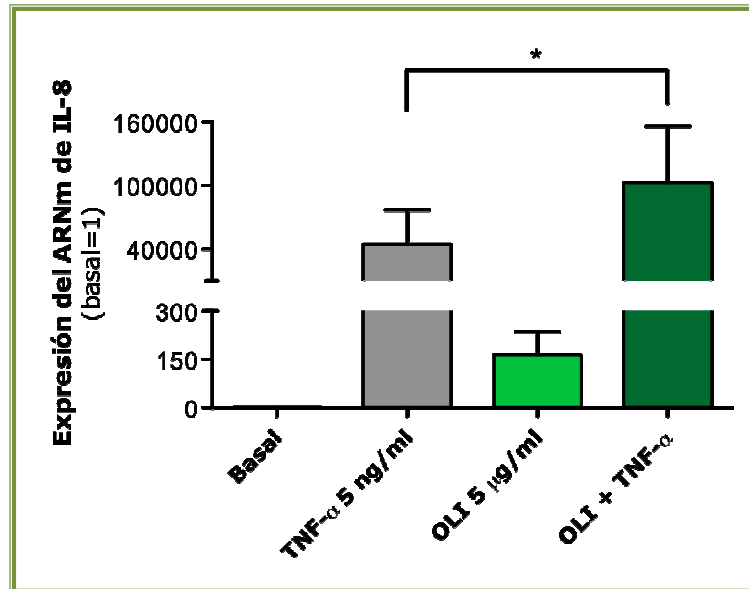


Figura 38: *Expresión del ARNm de IL-8 inducido por TNF- α en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM.* Los condrocitos humanos sembrados en placas de 6 pocillos se preincubaron durante 1 h con OLI (5 μ g/ml), y transcurrido este tiempo, se estimularon con TNF- α 5 ng/ml durante 4 h. Finalmente se extrajo el ARN y por PCR a tiempo real se valoró la expresión de IL-8. La gráfica muestra el ratio de expresión (basal=1) y representa la media \pm EE de 7 experimentos independientes por duplicado (* $p \leq 0.05$).

4.2. Modulación de la expresión proteica de IL-8

El siguiente paso fue corroborar a nivel de proteína estos resultados. Para ello, se emplearon las técnicas de ELISA e inmunocitoquímica.

Para el primero de estos estudios, se utilizaron los sobrenadantes de condrocitos incubados en placas de 96 a razón de 5×10^4 células/pocillo, preincubados 1 h con OLI y estimulados 18 h con TNF- α 5 ng/ml. Como se muestra en la **figura 39**, los resultados obtenidos para la expresión génica de IL-8 se confirmaron cuando la producción de la quimioquina se valoró mediante ELISA. Los valores alcanzados fueron de 11623 ± 3132 en la condición OLI + TNF- α frente a 8032 ± 2972 pg de IL-8 liberados por 5×10^4 células en la condición sin inhibición de la CRM ($n=7$; $p \leq 0.05$).

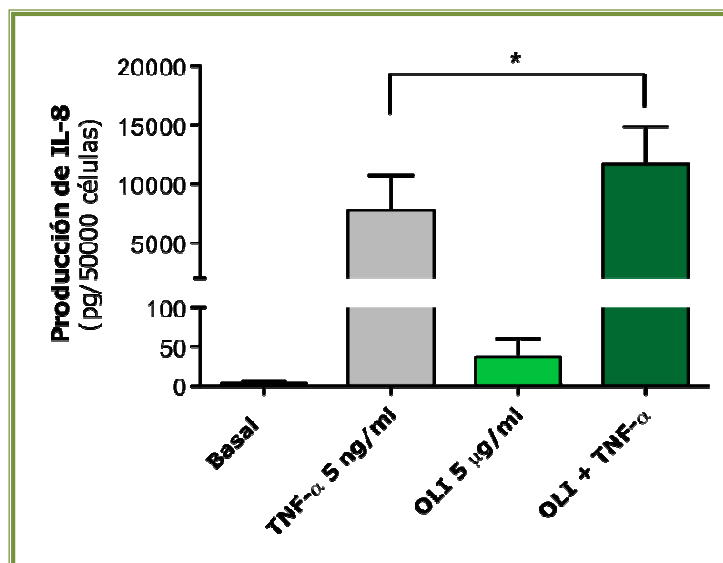


Figura 39: Producción de IL-8 inducida por TNF- α en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Los condrocitos humanos sembrados en placas de 96 pocillos se preincubaron durante 1 h con OLI (5 μ g/ml); posteriormente, las células se estimularon con TNF- α 5 ng/ml durante 18 h. La cantidad de IL-8 presente en los sobrenadantes resultantes se valoró mediante ELISA. La gráfica muestra la cantidad en pg de IL-8 liberada por 5×10^4 células y representa la media \pm EE de 7 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$).

Para los estudios de inmunocitoquímica, los condrocitos se cultivaron en portaobjetos acoplados a soporte de 8 pocillos con 2×10^4 células cada uno, y se trataron durante 8 h en condiciones idénticas a las ya descritas, observándose resultados similares a los obtenidos por PCR y ELISA (**figura 40**). Los controles negativos, muestras sin incubación con el anticuerpo primario, no mostraron señal positiva.

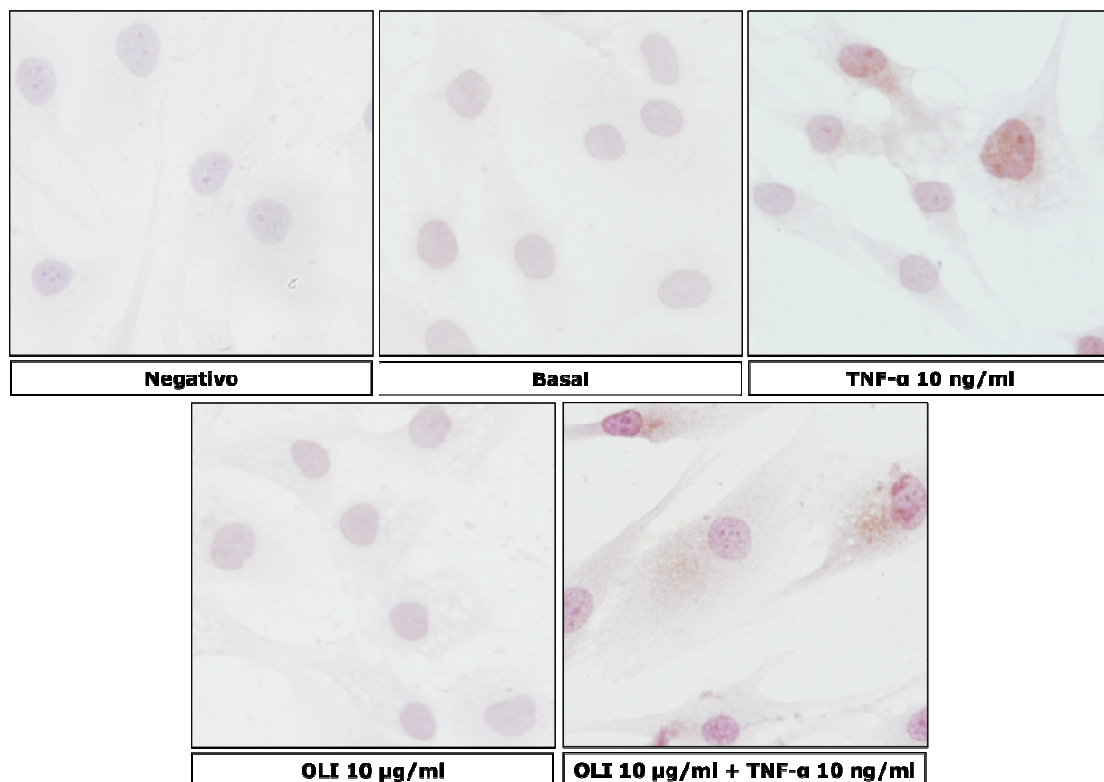


Figura 40: *Expresión proteica de IL-8 inducida por TNF- α en condrocitos sometidos a la disfunción en la CRM.* Los condrocitos humanos sembrados en portaobjetos acoplados a soporte de 8 pocillos se preincubaron durante 1 h con OLI (10 μ g/ml). Posteriormente, las células se estimularon con TNF- α 10 ng/ml durante 8 h. Para evitar la liberación al medio de IL-8, 4 h antes de finalizar el tiempo de incubación se añadió BD GolgiStop (0.7 μ l/ml). Finalmente, la expresión proteica de IL-8 se valoró por inmunocitoquímica. El control negativo consistió en la realización de la técnica sin anticuerpo primario. Las imágenes (a 200X aumentos) muestran un experimento representativo (n=3).

4.3. Modulación de la producción de PGE₂

El último objetivo de este bloque fue determinar si la disfunción mitocondrial también potenciaba la acción de TNF- α sobre la expresión de otros mediadores inflamatorios en el condrocito. De nuevo, seleccionamos para esta aproximación el estudio de los niveles de PGE₂.

Para ello, se preincubaron condrocitos sembrados en placas de 96 pocillos a razón de 5×10^4 células/pocillo con OLI 5 μ g/ml durante 1 h, y a continuación se estimularon con TNF- α 5 ng/ml durante 18 h. Una vez más, como se puede observar en la **figura 41**, los condrocitos pretratados con OLI y posteriormente con TNF- α presentaron niveles de PGE₂ mayores que aquellos incubados únicamente con los distintos estímulos por separado.

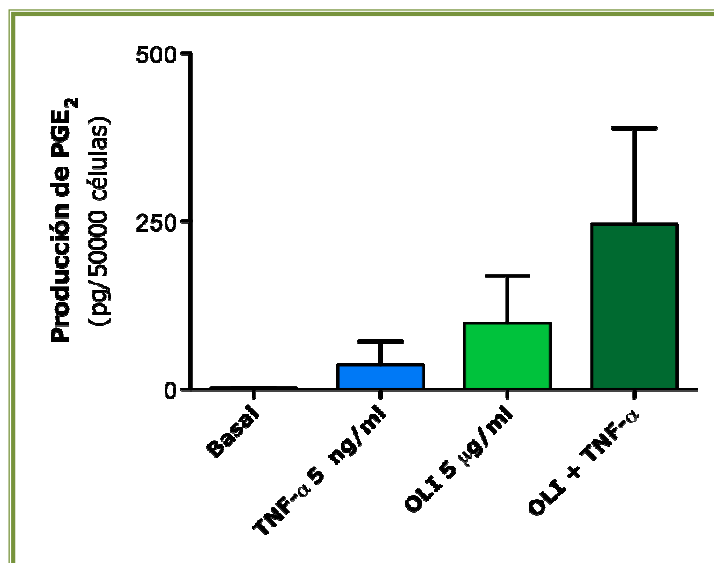


Figura 41: Producción de PGE₂ inducida por TNF-α en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Los condrocitos humanos sembrados en placas de 96 pocillos se preincubaron durante 1 h con OLI (5 μg/ml) y a continuación se estimularon con TNF-α 5 ng/ml durante 18 h. La cantidad de PGE₂ secretada en los sobrenadantes resultantes se valoró mediante ELISA. La gráfica muestra la cantidad en pg de PGE₂ liberada por 5×10^4 células y representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

Por tanto, la conclusión de este bloque es que la disfunción mitocondrial es capaz de incrementar también la respuesta inflamatoria inducida por la citoquina TNF-α en el condrocito, al potenciar la expresión génica y proteica de IL-8, así como del producto enzimático de la COX-2, la PGE₂.

5. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE LA PROTEÍNA OSCP SOBRE LA EXPRESIÓN INFLAMATORIA INDUCIDA POR IL-1β EN UNA LÍNEA CELULAR INMORTALIZADA DE CONDROCITOS

Después de observar que la disfunción mitocondrial inducida por inhibidores químicos potenciaba de forma sinérgica la acción inflamatoria de citoquinas como la IL-1β y el TNF-α, se quiso realizar un ensayo funcional más preciso empleando siARN dirigido contra la proteína del complejo V mitocondrial que confiere sensibilidad a OLI (OSCP). En concreto, se analizó el efecto de la reducción de la proteína OSCP mediante siARN sobre la expresión de IL-8 inducida por IL-1β.

Añadir que para solventar los problemas de disponibilidad de condrocitos normales humanos, este bloque de experimentos se realizó en la línea celular inmortalizada de condrocitos T/C-28a2. Estas células han sido habitualmente empleadas en el desarrollo de

estudios *in vitro* para evaluar la implicación del condrocito en la fisiología y fisiopatología del cartílago (Goldring et al., 1994).

5.1. Efecto de la inhibición química de la CRM sobre la expresión de IL-8 inducida por IL-1 β

En este quinto bloque de experimentos, se comenzó evaluando si la línea celular de condrocitos T/C-28a2 presentaba una respuesta a la disfunción de la CRM, análoga a la descrita en el cultivo primario de condrocitos humanos. Para ello, se testó el efecto del inhibidor del complejo V, OLI, sobre la expresión de IL-8 inducida por IL-1 β en estas células.

5.1.1. Modulación de la expresión génica de IL-8

En un primer lugar, se valoró mediante PCR a tiempo real el efecto de OLI sobre la expresión del ARNm de IL-8 inducida por IL-1 β a lo largo del tiempo. La línea celular de condrocitos se preincubó con OLI 5 μ g/ml durante 1 h y posteriormente se estimuló con IL-1 β 1 ng/ml durante 6, 9 o 18 h. Como control positivo de la inducción de la expresión de IL-8 se empleó IL-1 β 5 ng/ml.

Como se muestra en la **figura 42**, la preincubación con OLI potenció la expresión del ARNm de IL-8 inducido por IL-1 β . El mayor incremento se observó a las 9 h de estimulación, alcanzando incluso un valor de expresión mayor al inducido por una dosis 5 veces mayor de IL-1 β en ausencia del pretratamiento. Este efecto se perdió a las 18 h coincidiendo con el menor incremento en la expresión del ARNm de IL-8 inducida por el control positivo IL-1 β 5 ng/ml.

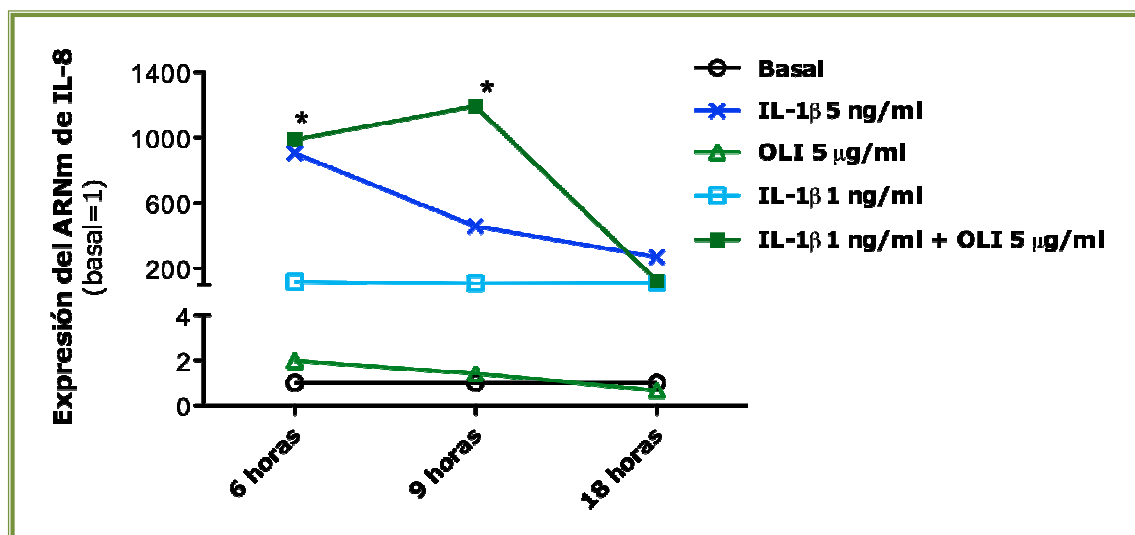


Figura 42: Expresión del ARNm de IL-8 inducido por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Estudios tiempo-dependencia. Los condrocitos sembrados en placas de 6 pocillos se preincubaron con OLI (5 μ g/ml) durante 1 h. Posteriormente, las células se trataron con IL-1 β 1 ng/ml durante 6, 9 o 18 h. La IL-1 β 5 ng/ml se empleó como control positivo. Transcurrido el tiempo de incubación, se extrajo el ARN y se valoró la expresión de IL-8 mediante ensayos de PCR a tiempo real. La gráfica muestra el ratio de expresión (basal=1) y representa la media \pm EE de 6 experimentos independientes realizados por duplicado (* $p \leq 0.05$ vs. IL-1 β 1 ng/ml).

5.1.2. Modulación de la expresión proteica de IL-8

Los resultados obtenidos a nivel de ARNm de IL-8 se confirmaron a nivel proteico mediante ELISA. Las células T/C-28a2 se pretrataron con OLI (5 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 h y a continuación se estimularon con diferentes dosis de IL-1 β (0.1, 1 y 5 ng/ml) a lo largo del tiempo (6, 9 y 18 h). En la **figura 43** se puede apreciar como la preincubación con OLI aceleró y amplificó la expresión de IL-8 inducida en el condrocito con todas las dosis de IL-1 β y a todos los tiempos de estimulación analizados. Estos datos permitieron concluir que la línea celular de condrocitos T/C-28a2 presenta una respuesta similar a la disfunción de la CRM a la descrita en el cultivo primario de condrocitos humanos.

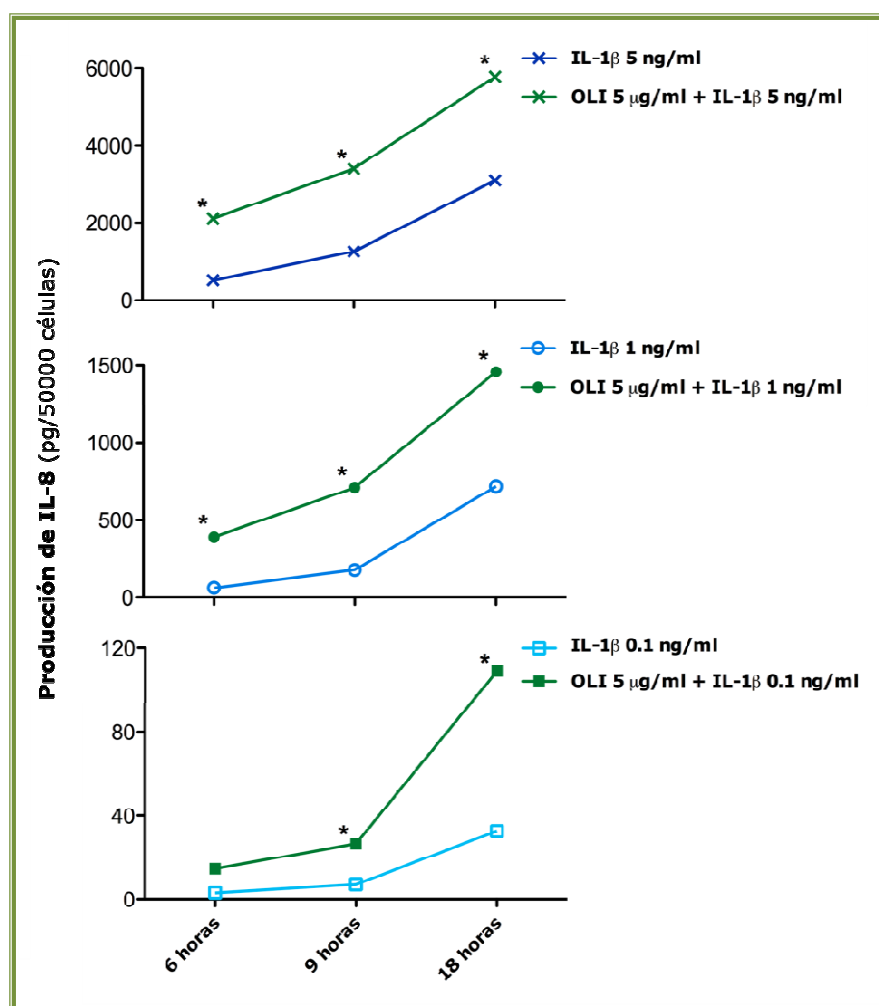


Figura 43: Producción de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos T/C-28a2 sometidos a la disfunción de la CRM. Estudios de dosis- y tiempo-dependencia. Los condrocitos sembrados en placas de 96 pocillos se preincubaron con OLI (5 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 h. Posteriormente, las células se estimularon con diferentes dosis de IL-1 β (0.1, 1 y 5 ng/ml) a lo largo del tiempo (6, 9 o 18 h). La cantidad de IL-8 secretada en los sobrenadantes resultantes se valoró mediante ELISA. La gráfica muestra la cantidad en pg de IL-8 liberada por 5×10^4 células y representa la media \pm EE de 6 experimentos independientes (* $p \leq 0,05$ vs. IL-1 β correspondiente sola).

5.2. Efecto del silenciamiento de la proteína OSCP sobre la expresión de IL-8 inducida por IL-1 β

Una vez demostrado que los condrocitos T/C-28a2 respondían a OLI de la misma manera en que lo hacían los condrocitos humanos en cultivo primario, se empleó esta línea celular para evaluar si el efecto del silenciamiento de OSCP (la proteína del complejo V de la CRM sobre la que actúa OLI) inducía el mismo efecto inflamatorio que OLI. Para ello, la línea celular de condrocitos se transfectó, como se indicó en la sección de *Materiales y Métodos*, con una combinación de tres secuencias nucleotídicas complementarias a una región del ARNm que codifica para OSCP, inhibiendo así su expresión.

5.2.1. Valoración de la eficacia de la transfección de siOSCP

5.2.1.a. Expresión génica de OSCP

Para corroborar que el silenciamiento se estaba produciendo de una manera efectiva, la expresión del ARNm de OSCP se valoró por PCR a tiempo real transcurridas 24, 48 y 72 h de la transfección. Como se observa en la **figura 44**, en los tres tiempos evaluados, la expresión del ARNm de OSCP en los condrocitos transfectados con ARN de silenciamiento frente a OSCP (siOSCP) era aproximadamente 10 veces menor que en la de aquellos transfectados con un ARN de silenciamiento control (SC; una secuencia de ARN no complementario a transcripto conocido) o sin transfectar (basal). La expresión del mensajero no se modificó significativamente en la condición SC con respecto a la de la basal.

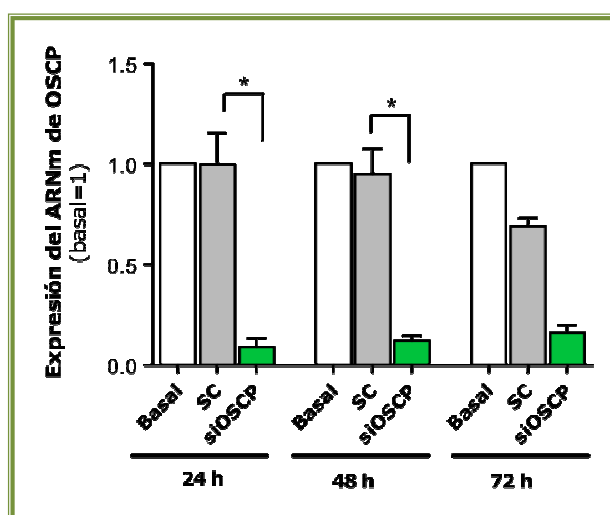


Figura 44: Eficacia de la transfección con ARN de interferencia de OSCP en condrocitos T/C-28a2. Expresión del ARNm de OSCP. Los condrocitos se transfectaron con ARN de silenciamiento según se indicó en *Materiales y Métodos* (Basal: no transfectadas; SC: ARN de silenciamiento control, una secuencia de ARN no complementario a transcripto conocido; siOSCP: mezcla de 3 secuencias de ARN complementarias al transcripto OSCP). Tras mantener en cultivo en placas de 6 pocillos 24, 48 o 72 h se extrajo el ARN y se valoró la expresión de OSCP mediante PCR a tiempo real. La gráfica muestra el ratio de expresión (basal=1) y representa la media \pm EE de 4 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$).

5.2.1.b. Expresión proteica de OSCP

El éxito de la transfección se confirmó posteriormente a nivel de proteína mediante la técnica *western blot*. Como se puede ver en la **figura 45A** se produjo una reducción en la expresión proteica de OSCP en los condrocitos transfectados con siOSCP a los 3 tiempos analizados. Además, estas diferencias de expresión fueron significativas transcurridas 48 h del

proceso de transfección (**figura 45B**). Nuevamente, los condrocitos transfectados con el siARN control no presentaron alterada la expresión de la proteína de interés.

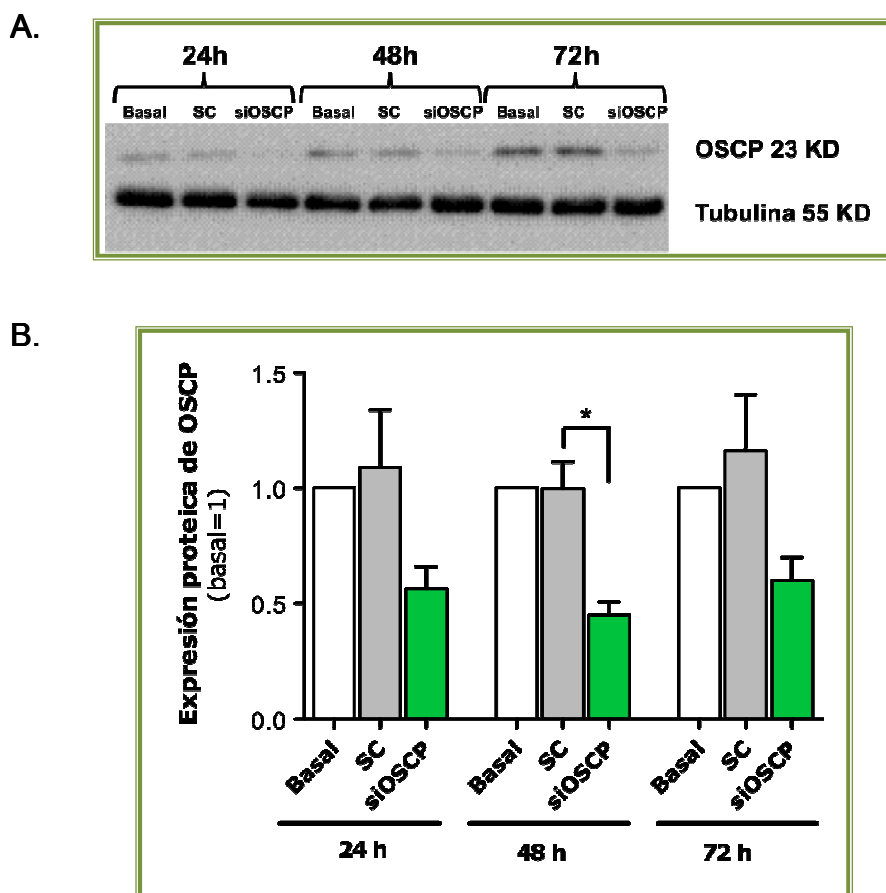


Figura 45: Eficacia de la transfección con ARN de interferencia de OSCP en condrocitos T/C-28a2. Expresión de la proteína OSCP. **A.** La línea celular se transfectó con ARN de silenciamiento según se indicó en *Materiales y Métodos* (Basal: no transfectadas; SC: ARN de silenciamiento control, es decir, una secuencia de ARN no complementario a transcripto conocido; siOSCP: con una mezcla de 3 secuencias de ARN complementarias al transcripto OSCP). Tras mantener en cultivo en placas de 6 pocillos durante 24, 48 o 72 h se lisaron las células y los niveles proteicos de OSCP fueron analizados mediante *western blot*. La cantidad de tubulina presente en cada muestra se empleó para normalizar el nivel de la carga. Se muestra la imagen de un experimento representativo de 3 independientes realizados. **B.** La expresión de OSCP se cuantificó como se indica en la sección *Materiales y Métodos*. La gráfica muestra la expresión proteica relativa de OSCP (basal=1) y representa la media \pm EE de 3 (24 y 72 h) o 5 (48 h) experimentos independientes.

5.2.2. Efecto del silenciamiento de OSCP sobre la expresión IL-8

Una vez demostrada la eficacia de la transfección, se evaluó si el silenciamiento de la proteína OSCP desencadenaba también el mismo efecto inflamatorio al descrito previamente con OLI, el inhibidor químico de esta proteína. Para ello, condrocitos transfectados con el ARN de silenciamiento se estimularon con IL-1 β (1 ng/ml) y transcurridas 24 h, se recogieron los sobrenadantes, realizándose la técnica de ELISA para determinar la cantidad de IL-8 liberada al medio.

Como se observa en la **figura 46**, los niveles de IL-8 inducidos por el tratamiento con IL-1 β 1 ng/ml durante 24 h eran significativamente mayores en los condrocitos transfectados con siOSCP, que en aquellos transfectados con el ARN de silenciamiento control (722.8 ± 210 vs. 623.8 ± 170.4 pg de IL-8 liberados por 5×10^4 células, respectivamente, $n=8$; $p \leq 0.05$).

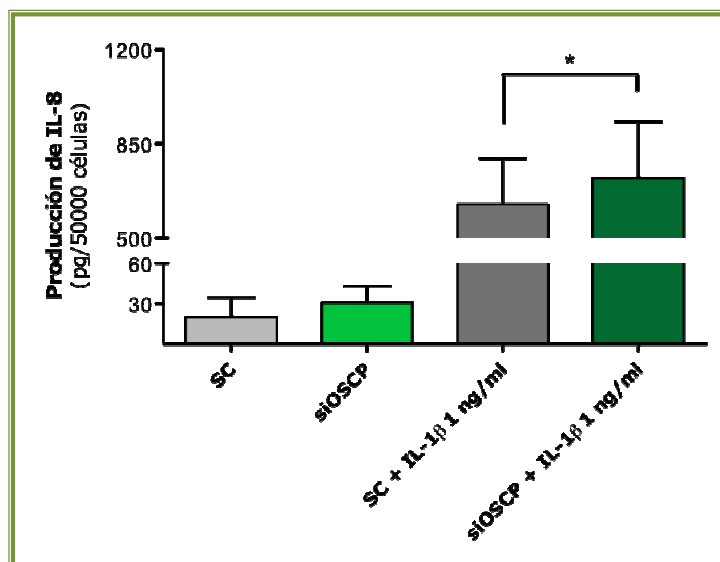


Figura 46: Efecto de la supresión de OSCP en la producción de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos T/C-28a2. La línea celular de condrocitos se transfectó con ARN de silenciamiento según se indica (SC: con una secuencia de ARN no complementaria a transcripto conocido; siOSCP: con una mezcla de 3 secuencias de ARN complementarias al transcripto OSCP) y se incubó en ausencia o presencia de IL-1 β 1 ng/ml durante 24 h. Posteriormente se cuantificó la concentración de IL-8 mediante ELISA. La gráfica muestra la cantidad en pg de IL-8 liberada por 5×10^4 células y representa la media \pm EE de 8 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$).

Por tanto, estos datos apoyan la hipótesis que la disfunción mitocondrial amplifica la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas en condrocitos humanos normales en cultivo.

6. MEDIADORES IMPLICADOS EN EL EFECTO INFLAMATORIO INDUCIDO POR LA DISFUNCIÓN DE LA CRM

El estrés oxidativo y el factor de transcripción NF- κ B, así como diversas vías apoptóticas están implicadas en la regulación de diferentes mediadores inflamatorios (Henrotin et al., 2003; Krysko et al., 2011; Pulai et al., 2005). Por ello, en el siguiente bloque de experimentos se investigó la participación de estos intermediarios en la amplificación de la respuesta inflamatoria a citoquinas inducida por la disfunción mitocondrial.

Estos estudios se centraron mayoritariamente en la quimioquina IL-8, por entender que era representativa del efecto inflamatorio global de la inhibición mitocondrial.

6.1. Implicación de ROS en la amplificación de la respuesta inflamatoria a citoquinas inducida por la disfunción mitocondrial

Nuestro laboratorio ha descrito que la estimulación de condrocitos con AA u OLI incrementa los niveles de ROS celulares (Cillero-Pastor et al., 2008). Teniendo en cuenta este hallazgo, además de una extensa bibliografía que ha asociado ROS con vías de señalización pro-inflamatorias, se estudió si ROS intervenía en el efecto sinérgico que la disfunción de la CRM provocaba en la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas en los condrocitos.

Para evaluar si el aumento en los niveles de ROS estaba implicado en el incremento de la expresión de IL-8, se empleó el agente ‘secuestrador’ de ROS N-acetilcisteína (NAC, 40 mM). En concreto, las células se preincubaron 1 h con NAC 40 mM y a continuación se estimularon según se detalló en los bloques anteriores; es decir, 1 h de preincubación con AA u OLI (10 µg/ml) seguida de 8 h de estimulación con IL-1 β 1.5 ng/ml. En la **figura 47** se observa como el tratamiento de las células con NAC redujo prácticamente a niveles basales el número de células positivas para IL-8. Los valores obtenidos reflejan una reducción del 87% y del 88% vs. control 100%, para AA + IL-1 β y OLI + IL-1 β , respectivamente (n=4; p \leq 0.05 y p \leq 0.01, respectivamente). Como se esperaba, la incubación con NAC por sí sola no tuvo efecto alguno en la expresión de la quimioquina (datos no mostrados).

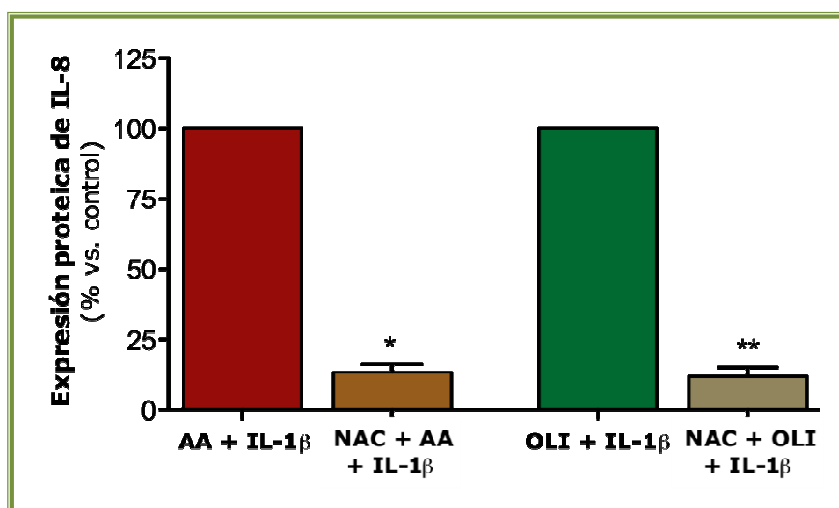


Figura 47: Efecto de N-acetilcisteína sobre la expresión proteica de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Los condrocitos humanos sembrados en placas de 6 pocillos se preincubaron durante 1 h con N-acetilcisteína (NAC; 40 mM). A continuación, las células se pretrataron con AA (10 µg/ml) u OLI (10 µg/ml) durante 1 h para finalmente ser estimuladas con IL-1 β 1.5 ng/ml durante 8 h. Para evitar la liberación de IL-8 al medio, 4 h antes de finalizar el tiempo de incubación se añadió BD GolgiStop (0.7 µl/ml). Finalmente, la expresión de IL-8 se valoró por citometría de flujo. La gráfica muestra el porcentaje de la intensidad de fluorescencia, y representa la media \pm EE de 4 experimentos independientes (*p \leq 0.05; **p \leq 0.01 vs. control 100% sin tratamiento con NAC).

La **figura 48** muestra un ejemplo de los histogramas obtenidos mediante citometría de flujo y el perfil de expresión proteica de IL-8 bajo las distintas condiciones. Se ha superpuesto el perfil de la condición AA + IL-1 β u OLI + IL-1 β sobre la condición tratada con NAC, para una mejor visualización del desplazamiento hacia valores de menor positividad.

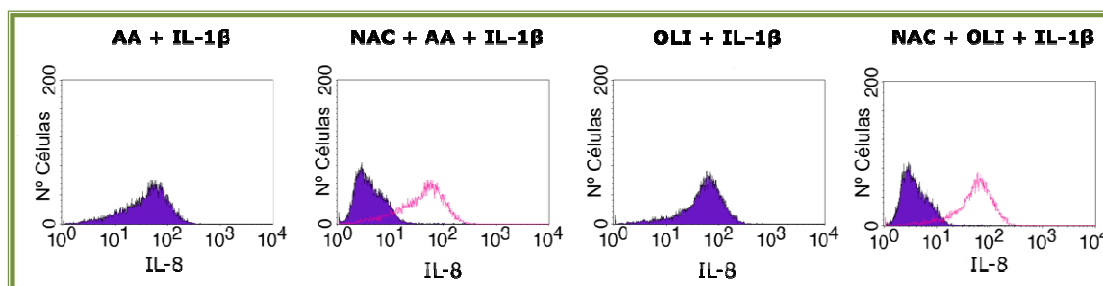


Figura 48: Ejemplo de citometría de flujo evaluando la expresión de IL-8 bajo la reducción en los niveles de ROS. Histogramas de un experimento representativo en el que se puede apreciar como la población positiva para IL-8 en el eje de abscisas y como esta se desplazó hacia valores menores cuando los condrocitos se trataron previamente con NAC. En rosa se superpone el perfil de la condición control para una mejor visualización del desplazamiento de la población.

6.2. Implicación del factor de transcripción NF- κ B en la amplificación de la respuesta inflamatoria a citoquinas inducida por la disfunción mitocondrial

La actividad de un gran número de factores de transcripción, entre los que se encuentra NF- κ B, puede estar regulada por el estrés oxidativo (Kabe et al., 2005). Este factor es uno de los principales factores implicados en la regulación de la transcripción de múltiples genes pro-inflamatorios, incluidos IL-8 y COX-2 (Pulai et al., 2005). Además, IL-1 β es un potente inductor de la actividad NF- κ B. Por estos motivos, y dado que previamente se demostró el papel de ROS en el efecto sinérgico de la disfunción mitocondrial sobre la expresión de IL-8 inducida por citoquinas en los condrocitos, se evaluó si NF- κ B estaba también involucrado en este proceso. Para ello, se utilizaron dos aproximaciones diferentes: en primer lugar, se determinó la actividad NF- κ B mediante EMSA; y en segundo lugar, se valoró el efecto de la inhibición de NF- κ B sobre la expresión de IL-8.

6.2.1. Efecto de la disfunción de la CRM en la translocación nuclear de NF- κ B inducida por IL-1 β

En primer lugar se estudió, mediante ensayo de retardo en gel (EMSA), el efecto sobre la actividad de NF- κ B que la disfunción mitocondrial provocaba en condrocitos humanos tratados con IL-1 β . Puesto que su activación suele ser temprana, los ensayos EMSA se realizaron tras 1 h de incubación. Como se puede observar en la **figura 49**, la incubación de los condrocitos con OLI (10 μ g/ml) durante 1 h no moduló los niveles basales de NF- κ B; sin embargo, la preincubación con OLI sí incrementó la activación de NF- κ B inducida por IL-1 β

(1.5 ng/ml). Este incremento produjo una señal similar a la alcanzada con una concentración tres veces superior de IL-1 β (5 ng/ml). De esta forma, de nuevo el tratamiento con un inhibidor de la CRM redujo la concentración umbral de IL-1 β necesaria para inducir un nivel de activación de NF- κ B similar al obtenido por una concentración superior de IL-1 β .

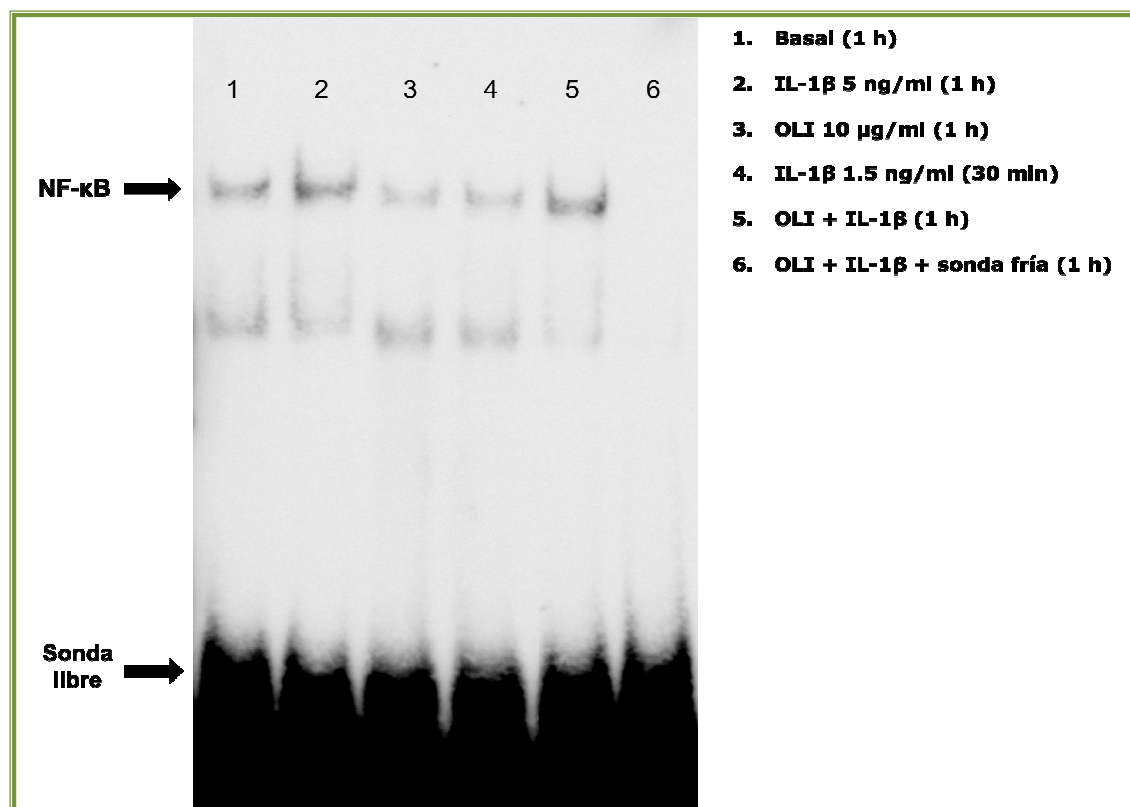


Figura 49: Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la activación de NF- κ B inducida por IL-1 β en condrocitos humanos en cultivo. Condrocitos normales se incubaron durante 1 h en condiciones basales (carril 1), o en la presencia del control positivo IL-1 β 5 ng/ml (1 h; carril 2), OLI 10 μ g/ml (1 h; carril 3), IL-1 β 1.5 ng/ml (30 min; carril 4) o la combinación OLI + IL-1 β 1.5 ng/ml (carril 5; los 30 primeros min con OLI 10 μ g/ml seguido por una estimulación con IL-1 β 1.5 ng/ml de otros 30 min; tiempo total 1 h). Tras la obtención de los extractos nucleares se realizaron los ensayos EMSA. La especificidad del ensayo se verificó mediante experimentos de competición con una sonda no marcada de NF- κ B en un exceso de 100 veces (sonda fría; carril 6). Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

6.2.2. Efecto de la inhibición de NF- κ B sobre la expresión de IL-8

A continuación, se determinó si este aumento en la actividad NF- κ B descrito participaba en el efecto amplificador que la inhibición de la CRM provocaba sobre la expresión de IL-8 inducida por citoquinas en el condrocito. Para ello, se utilizó el inhibidor de la activación de NF- κ B, Bay 11-7082 (Bay; 5 μ M). Bay es un inhibidor de la fosforilación del represor natural de NF- κ B, I κ B α . Como se reflejó en la sección de *Introducción*, I κ B α mantiene secuestrado a NF- κ B en el citoplasma a menos que sea fosforilado, permitiendo entonces su liberación y translocación al núcleo. Por ello, para realizar estos experimentos los condrocitos se preincubaron durante 1 h con Bay y a continuación se realizó el tratamiento de

estimulación descrito anteriormente durante 8 h. Como muestra la **figura 50**, el pretratamiento de los condrocitos con el inhibidor de NF- κ B redujo significativamente la expresión proteica de IL-8. Los valores obtenidos fueron de 30.20 ± 9.96 y $12.53 \pm 2.36\%$ frente al valor del 100% de la condición control sin tratar, AA u OLI + IL-1 β , respectivamente ($n=4$; $*p \leq 0.05$ y $**p \leq 0.01$). Se obtuvieron resultados similares cuando la producción de IL-8 se valoró a las 18 h de estimulación mediante ELISA (resultados no mostrados).

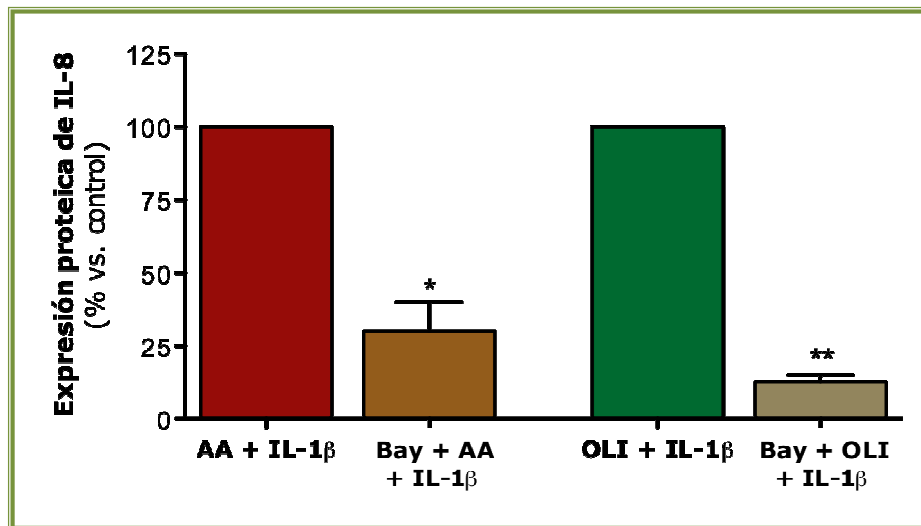


Figura 50: Efecto de Bay-117082 sobre la expresión proteica de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Los condrocitos humanos sembrados en placas de 6 pocillos se preincubaron durante 1 h con Bay-117082 (Bay; 5 μ M). A continuación, las células se pretrataron con AA (10 μ g/ml) u OLI (10 μ g/ml) durante 1 h, y se estimularon 8 h más con IL-1 β 1.5 ng/ml. Para evitar la liberación de IL-8 al medio, 4 h antes de finalizar el tiempo de incubación se añadió BD GolgiStop (0.7 μ l/ml). Finalmente, la expresión de IL-8 se valoró por citometría de flujo. La gráfica muestra el porcentaje de la intensidad de fluorescencia, y representa la media \pm EE de 4 experimentos independientes ($*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.01$ vs. control 100% sin tratamiento con Bay).

En la **figura 51** se muestra un ejemplo de los histogramas obtenidos mediante la técnica de citometría de flujo. Marcada con línea rosa se muestra la expresión de IL-8 inducida por la sinergia entre IL-1 β y los inhibidores de la CRM, observándose como esta se redujo cuando las células se pretrataron con Bay.

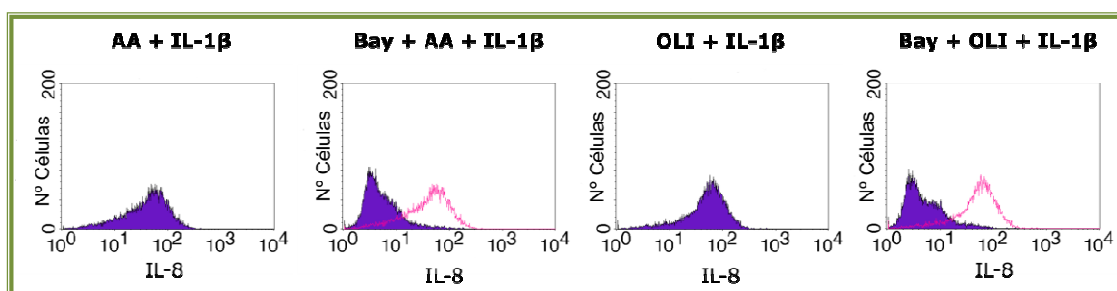


Figura 51: Ejemplo de citometría de flujo evaluando la expresión de IL-8 bajo la inhibición de actividad nuclear de NF- κ B. Las imágenes muestran histogramas de un experimento representativo en el que se puede observar como los valores de IL-8 inducidos por la sinergia AA u OLI + IL-1 β , expresados como intensidad de fluorescencia (eje de abscisas), disminuyen cuando los condrocitos se trataron previamente con Bay 5 μ M.

6.3. Implicación de vías de señalización de muerte en la respuesta inflamatoria inducida por la disfunción mitocondrial

Recientemente se ha descrito que la disfunción mitocondrial tras promover la apoptosis u otros tipos de muerte, induce la acumulación de ROS y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs; p.e. ATP, péptidos N-formil) con capacidad inmunogénica, desencadenando así una respuesta inflamatoria (Krysko et al., 2010; Shimada et al., 2012). En este estudio se quiso evaluar si la activación de vías apoptóticas por la inhibición de la CRM, podría estar implicada en el efecto inflamatorio sinérgico anteriormente descrito.

6.3.1. Estudios de muerte celular

Son varias las estrategias que se pueden utilizar en la detección de células apoptóticas (Taates et al., 2008). Una de las más utilizadas consiste en el análisis de modificaciones en la morfología del núcleo, como es el cambio en la condensación y la fragmentación de la cromatina, mediante tinción con DAPI. Para realizar esta técnica, los condrocitos se cultivaron en portaobjetos acoplados a soporte de 8 pocillos a razón de 2×10^4 células/pocillo, y se estimularon durante 9 o 18 h con diferentes dosis de AA (10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) u OLI (5 y 10 $\mu\text{g/ml}$).

Como se muestra en la **figura 52A** se observó una condensación de los núcleos con las dosis más altas de los inhibidores y con el tiempo de incubación más largo. Sin embargo, la fragmentación del ADN típica de apoptosis (cuerpos apoptóticos) no se detectó. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en los estudios de viabilidad celular realizados mediante ensayo MTT. Para estos ensayos, los condrocitos se cultivaron en placas de 96 a razón de 5×10^4 células/pocillo, y se estimularon durante 9 o 18 h con las mismas dosis de AA u OLI que en los ensayos de muerte celular por DAPI. Los condrocitos incubados con la dosis más alta de AA (20 $\mu\text{g/ml}$) mostraron una pérdida en su viabilidad a los dos tiempos testados de incubación (9 y 18 h), mientras que para la mayor dosis de OLI (10 $\mu\text{g/ml}$) esta reducción en su supervivencia solo se observó a las 18 h (**figura 52B**).

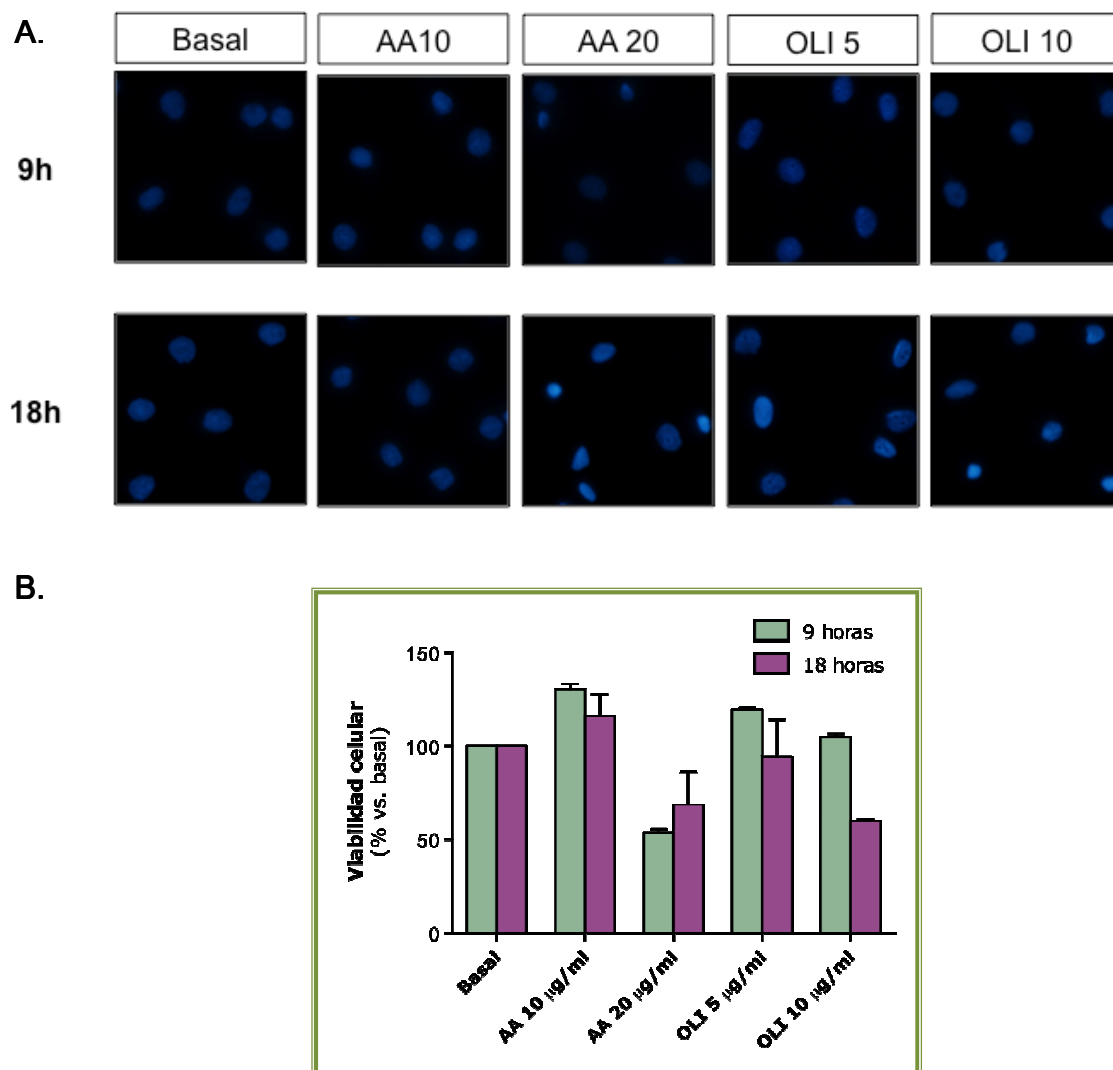


Figura 52: Valoración de la muerte celular en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. **A.** Los condrocitos humanos sembrados en portaobjetos acoplados a soporte de 8 pocillos se estimularon con AA (10 y 20 µg/ml) u OLI (5 y 10 µg/ml) durante 9 o 18 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se fijaron las células y se tiñeron con DAPI como se describe en la sección *Materiales y Métodos*. La figura muestra fotografías representativas de un experimento de un total de 3 independientes realizados. **B.** Las células sembradas en placas de 96 pocillos se estimularon como se indicó previamente durante 9 o 18 h. A continuación, se valoró la viabilidad celular mediante ensayo de MTT. Los datos se corresponden con el porcentaje de células viables (basal=100%), y muestran la media ± EE de 3 experimentos independientes.

6.3.2. Implicación de las caspasas en la producción de PGE₂ inducida por la inhibición química de la CRM

Las caspasas 3 y 7 son proteasas efectoras en la activación de las vías apoptóticas extrínsecas e intrínsecas. Tras detectar indicios de muerte en el condrocito mediante su estimulación con los inhibidores de la CRM, parecía de interés estudiar el efecto que el bloqueo de caspasas apoptóticas pudiera tener sobre la expresión inflamatoria inducida por OLI. Por ello, los condrocitos se cultivaron en placas de 96 pocillos con una densidad de 5×10^4 células/pocillo, se preincubaron 2 h con zDEVD-FMK (50 µM), un inhibidor de las caspasas 3/7, y a continuación se estimularon con OLI (10 µg/ml) durante 18 h. Trascendido este tiempo, se

recogieron los sobrenadantes y se evaluó mediante ELISA la producción de PGE_2 , observándose un descenso significativo en los niveles de PGE_2 en aquellas condiciones que habían sido tratadas con el inhibidor de las caspasas ($n=4$; $p \leq 0.05$) (figura 53).

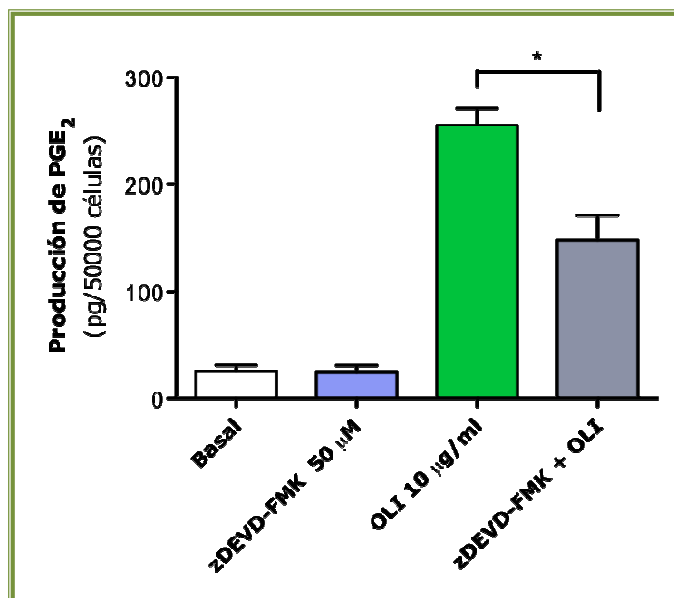


Figura 53: Efecto de la inhibición de la actividad de las caspasas 3/7 sobre la producción de PGE_2 en condrocitos sometidos a la disfunción de su CRM. Los condrocitos humanos sembrados en placas de 96 pocillos se preincubaron con el inhibidor de caspasas 3/7 zDEVD-FMK (50 μM) durante 2 h. A continuación, se añadió OLI (10 $\mu\text{g/ml}$). Transcurridas 18 h de incubación, la cantidad de PGE_2 secretada en los sobrenadantes resultantes se valoró mediante ELISA. La gráfica muestra la cantidad en pg de PGE_2 liberada por 5×10^4 células y representa la media \pm EE de 4 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$).

6.3.3. Implicación de las caspasas en la producción de IL-8 inducida por el silenciamiento de la proteína OSCP

Para confirmar la implicación de las caspasas en el efecto amplificador que la disfunción mitocondrial ejerce sobre la respuesta inflamatoria a citoquinas, se estudió si el inhibidor general de las caspasas, zVAD-FMK, modulaba también la expresión inflamatoria inducida por IL-1 β en condrocitos T/C-28a2 transfectados con siOSCP. Como se observa en la figura 54, la inhibición general de la actividad de las caspasas bloqueó significativamente el efecto sinérgico del silenciamiento de OSCP e IL-1 β sobre la producción de IL-8 (293.1 ± 175.3 vs. 702.2 ± 266.9 sin tratamiento con zVAD-FMK).

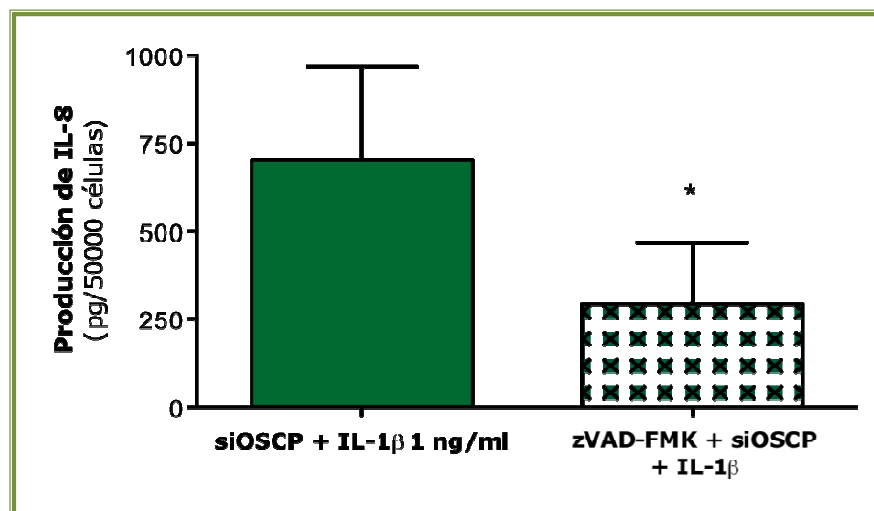


Figura 54: Efecto de la inhibición de las caspasas sobre la producción de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos T/C-28a2 transfectados con siOSCP. La línea celular de condrocitos se transfectó con el ARN de silenciamiento siOSCP (una mezcla de 3 secuencias de ARN complementarias al transcripto OSCP). A continuación las células se sembraron en placas de 96 pocillos, se preincubaron con un inhibidor general de caspasas (zVAD-FMK 50 μ M) durante 2 h y se añadió IL-1 β 1 ng/ml. Transcurridas 24 h de incubación se cuantificó en el sobrenadante resultante la concentración de IL-8 mediante ELISA. La gráfica muestra la cantidad en pg de IL-8 liberada por 5×10^4 células y representa la media \pm EE de 5 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$).

En resumen, en este bloque de resultados se demuestra que ROS, NF- κ B y la activación de caspasas, participan activamente en el efecto inflamatorio *per se* y en el exacerbador a citoquinas que la disfunción mitocondrial ejerce sobre condrocitos en cultivo.

7. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA A CITOQUINAS INDUCIDA POR LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

El resveratrol (RSV) es un polifenol natural de origen vegetal que se encuentra a altas concentraciones en la piel de las uvas negras y en los frutos rojos. Una amplia y reciente literatura evidencia sus efectos beneficiosos anti-oxidantes, anti-inflamatorios, anti-cancerígenos, anti-fibróticos y como resultado anti-envejecimiento. En concreto, múltiples estudios *in vitro* en diferentes tipos celulares, incluidos los condrocitos, demuestran que el RSV es capaz de reducir los niveles de ROS, la activación de NF- κ B, o modular diferentes vías apoptóticas a través de la protección de la función mitocondrial (Csaki et al., 2009; Dave et al., 2008; Monográfico resveratrol, 2010; Shakibaei et al., 2009)

Teniendo en cuenta esta bibliografía previa, y puesto que los datos obtenidos sugerían la participación de ROS, NF- κ B y caspasas en el aumento sinérgico de la expresión de IL-8 y

PGE₂ inducido por la disfunción mitocondrial y las citoquinas, se quiso evaluar si el tratamiento con RSV podía prevenir la respuesta inflamatoria descrita.

7.1. Modulación en la expresión proteica de IL-8

En una primera aproximación de este estudio, se evaluó el efecto de RSV sobre la expresión proteica de IL-8 mediante citometría de flujo. Como se observa en la **figura 55**, la coincubación de RSV 250 μ M con AA u OLI (ambos a la dosis de 10 μ g/ml) y posterior estimulación con IL-1 β 1.5 ng/ml durante 8 horas, descendió significativamente la expresión de la proteína IL-8 inducida por la respuesta sinérgica entre disfunción mitocondrial y citoquinas. Los valores observados, en los condrocitos tratados con RSV, se correspondieron con una reducción del 80 y 79% vs. 100% en la expresión de IL-8 inducida por AA u OLI + IL-1 β , respectivamente (n=4; p \leq 0.01).

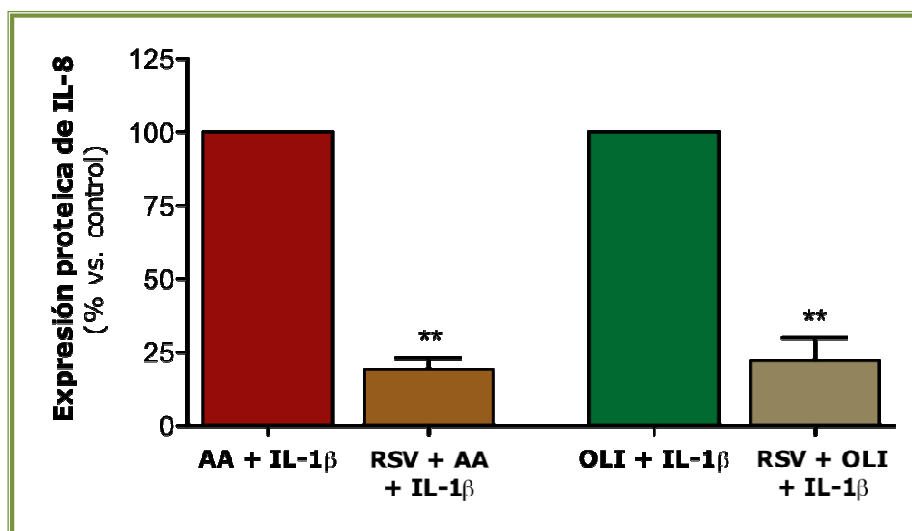


Figura 55: Efecto de RSV sobre la expresión proteica de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Los condrocitos humanos sembrados en placas de 6 pocillos se coincubaron con RSV (250 μ M) y AA (10 μ g/ml) u OLI (10 μ g/ml) durante 1 h. Posteriormente se estimularon con IL-1 β 1.5 ng/ml durante 8 h. Para evitar la liberación de IL-8 al medio, 4 h antes de finalizar el tiempo de incubación se añadió BD GolgiStop (0.7 μ l/ml). Finalmente, la expresión de IL-8 se valoró por citometría de flujo. La gráfica muestra el porcentaje de la intensidad de fluorescencia y representa la media \pm EE de 4 experimentos independientes (**p \leq 0.01 vs. control sin tratamiento con RSV).

En la **figura 56**, los histogramas representan un experimento representativo en el que se puede apreciar como las células incubadas con RSV, mostraron valores de positividad de IL-8 menores a los alcanzados por la sinergia entre disfunción mitocondrial e IL-1 β sin el tratamiento.

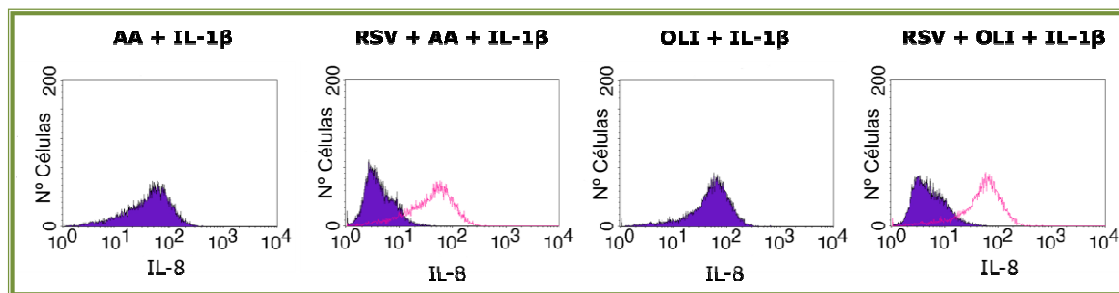


Figura 56: Ejemplo de citometría de flujo evaluando la expresión de *IL-8* bajo el tratamiento con RSV. Los histogramas muestran un experimento representativo en el que se puede observar los valores de *IL-8* inducidos por la sinergia AA u OLI + *IL-1β* expresados como intensidad de fluorescencia (eje de abscisas) y como disminuyen cuando los condrocitos se trataron con RSV 250 μ M. En rosa se superpone el perfil de la condición control (AA u OLI + *IL-1β*) para una mejor visualización del desplazamiento de la población.

Estos resultados se confirmaron mediante ELISA, a un tiempo mayor de estimulación (18 h) y con dos dosis diferentes de RSV (50 y 250 μ M), registrándose unos niveles de inhibición similares del 89% y 88 % respectivamente ($n=6$; $p \leq 0.05$) (**figura 57**). El tratamiento de los condrocitos únicamente con RSV no moduló la expresión basal de *IL-8* (datos no mostrados).

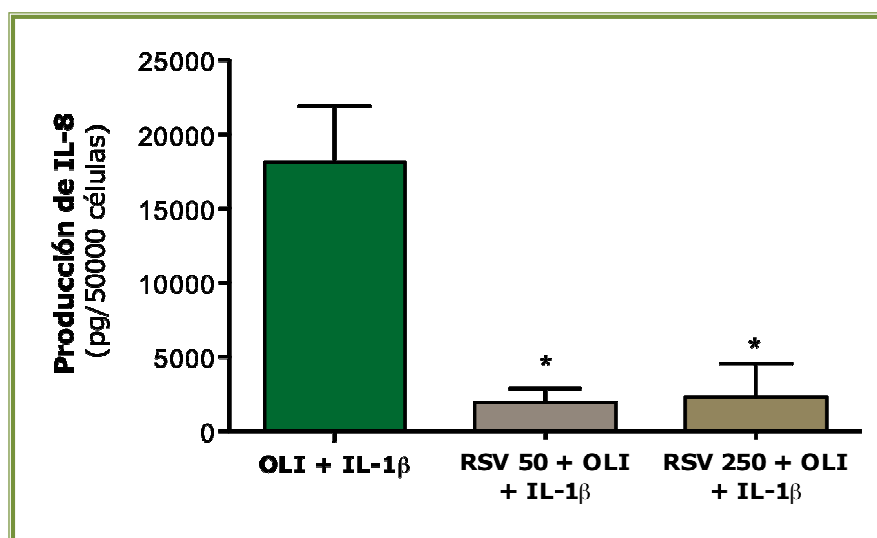


Figura 57: Efecto de RSV sobre la producción de *IL-8* inducida por *IL-1β* en condrocitos sometidos a una disfunción en la CRM. Los condrocitos humanos sembrados en placas de 96 pocillos se preincubaron con RSV (50 y 250 μ M) junto con OLI (5 μ g/ml) durante 1 h y a continuación se estimularon con *IL-1β* 0.5 ng/ml durante 18 h. La cantidad de *IL-8* secretada en los sobrenadantes resultantes se valoró mediante ELISA. La gráfica muestra la cantidad en pg de *IL-8* liberada por 5×10^4 células y representa la media \pm EE de 6 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$ vs. sin tratamiento con RSV).

7.2. Modulación del poder quimiotáctico de neutrófilos

De manera análoga, se evaluó si el descenso observado en la expresión proteica de IL-8 con la coincubación con RSV se correlacionaba también con una disminución del poder quimiotáctico sobre los neutrófilos. Los condrocitos se preincubaron con OLI (5 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 h en la presencia o ausencia de RSV (50 μM), y posteriormente se estimularon con IL-1 β (0.5 ng/ml). A continuación, se evaluó en los sobrenadantes del cultivo resultantes la capacidad de atracción de neutrófilos mediante ensayos de *Transwell*. Como se puede observar en la **figura 58**, se produjo una reducción significativa en la migración de neutrófilos en aquellas condiciones coincubadas con RSV ($n=6$; $p\leq 0.05$).

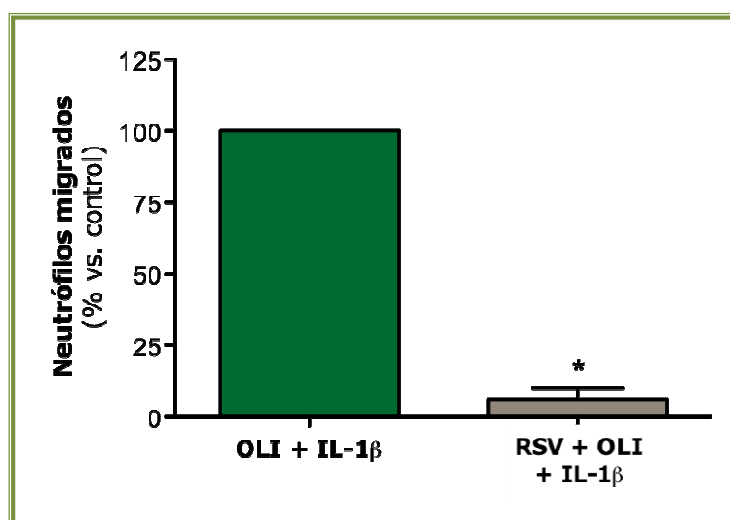


Figura 58: Efecto de RSV sobre la quimioaxis de neutrófilos inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM. Los condrocitos humanos sembrados en placas de 12 pocillos se coincubaron con RSV (50 μM) junto con OLI (5 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 h y a continuación se estimularon con IL-1 β 0.5 ng/ml durante 18 h. Se recogieron los sobrenadantes y se determinó su poder quimiotáctico según se describe en *Materiales y Métodos*. La gráfica muestra el número de neutrófilos migrados, y representa la media \pm EE de 6 experimentos independientes realizados por duplicado (* $p\leq 0.05$ vs. control sin tratamiento con RSV).

7.3. Modulación de la producción de PGE₂

Siguiendo el mismo abordaje experimental, se evaluó también el efecto del RSV sobre la producción de PGE₂ inducida por citoquinas en condrocitos con disfunción mitocondrial, registrando una vez más el efecto anti-inflamatorio de esta molécula. Como se observa en la **figura 59**, el RSV redujo significativamente la liberación de PGE₂ inducida por la sinergia entre OLI + IL-1 β (n=6; p \leq 0.05).

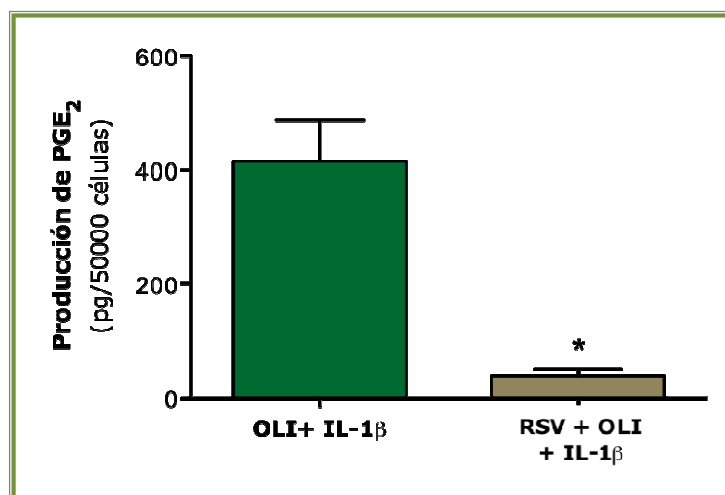


Figura 59: *Efecto de RSV sobre la producción de PGE₂ inducida por IL-1 β en condrocitos sometidos a la disfunción de la CRM.* Los condrocitos humanos sembrados en placas de 96 pocillos se preincubaron con RSV (50 μ M) y OLI (10 μ g/ml) durante 1 h y a continuación se estimularon con IL-1 β 1.5 ng/ml durante 18 h. La cantidad de PGE₂ secretada en los sobrenadantes resultantes se valoró mediante ELISA. La gráfica muestra la cantidad en pg de PGE₂ liberada por 5x10⁴ células y representa la media \pm EE de 6 experimentos independientes (*p \leq 0.05 vs. control sin tratamiento con RSV).

7.4. Modulación de la expresión de IL-8 inducida por el silenciamiento de OSCP

En los apartados anteriores de este último bloque, se demostró como RSV inhibía el efecto inflamatorio inducido por IL-1 β en los condrocitos humanos pretratados con el inhibidor mitocondrial OLI. Para confirmar que RSV actuaba específicamente sobre el efecto de la inhibición de la función mitocondrial, se analizó si esta molécula también modulaba la expresión de IL-8 inducida por IL-1 β en las células T/C-28a2 tranfectadas con siOSCP.

En la **figura 60** se muestra como el tratamiento de estas células con RSV redujo de forma significativa la expresión de IL-8, alcanzando una inhibición del 51% vs 100% en la condición sin pretratamiento (n=5; p \leq 0.05).

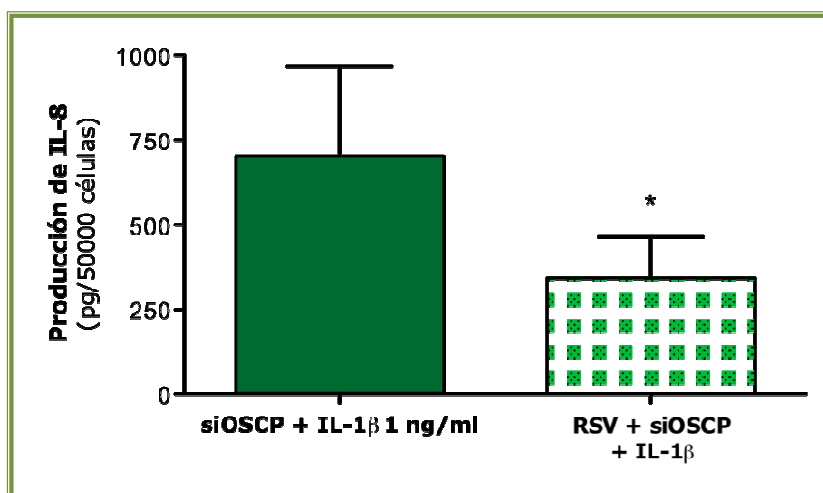


Figura 60: *Efecto de RSV sobre la producción de IL-8 inducida por IL-1 β en condrocitos T/C-28a2 transfectados con siOSCP.* La línea celular de condrocitos se transfectó con el ARN de silenciamiento siOSCP (una mezcla de 3 secuencias de ARN complementarias al transcrito OSCP). A continuación, las células se sembraron en placas de 96 pocillos e incubaron con IL-1 β 1 ng/ml en ausencia o presencia de RSV 50 μ g/ml durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificó en el sobrenadante resultante la concentración de IL-8 mediante ELISA. La gráfica muestra la cantidad en pg de IL-8 liberada por 5×10^4 células y representa la media \pm EE de 5 experimentos independientes (* $p \leq 0.05$).

Por tanto, el conjunto de estos resultados demuestran que el RSV disminuye la respuesta inflamatoria inducida por la sinergia entre la disfunción mitocondrial y la IL-1 β , al reducir los niveles de expresión de PGE₂ e IL-8 en condrocitos humanos en cultivo.

B. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN UN MODELO MURINO *IN VIVO* DE DAÑO ARTICULAR POR DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

En el apartado anterior se demostró *in vitro* que la inhibición de la CRM puede generar por sí sola una débil pero significativa respuesta inflamatoria en el condrocito, además de incrementar sinérgicamente la señal inflamatoria inducida por dos de las principales citoquinas implicadas en el proceso inflamatorio y destructivo del cartílago durante la OA. En esta misma línea, otros estudios han demostrado también en condrocitos y sinoviocitos la implicación de la disfunción mitocondrial *per se* en algunas de las respuestas catabólicas de estas células (Cillero-Pastor et al., 2008; Harty et al., 2012; Milner et al., 2007; Ospelt y Gay, 2005). Teniendo en cuenta el conjunto de estos hallazgos, se planteó un segundo bloque de estudios en el que evaluar *in vivo* si la disfunción mitocondrial podría desencadenar una respuesta inflamatoria similar a la descrita *in vitro*.

Como se detalló en la sección de *Materiales y Métodos*, este estudio *in vivo* de disfunción mitocondrial se llevó a cabo mediante la inyección intraarticular del inhibidor mitocondrial del complejo V, OLI en ratas *Wistar*. Los animales (n=45; 3-5 meses de edad) se distribuyeron en 3 grupos: grupo sano (no recibió inyección intraarticular), grupo LPS (articulación izquierda inyectada con LPS 10 µg y contralateral con el mismo volumen de vehículo) y grupo OLI (articulación izquierda inyectada con OLI 20 µg y contralateral con el mismo volumen de vehículo).

Dado que el objetivo principal del estudio fue analizar la respuesta inflamatoria más que la destructiva, se desarrolló un modelo agudo en el que se practicaron 3 inyecciones intraarticulares en las patas traseras en los días 0, 2 y 5, siendo los animales sacrificados en el día 6. En base a la literatura previa, el grupo LPS se empleó como control positivo de respuesta inflamatoria (Idogawa et al., 1998).

A continuación se detallan los resultados obtenidos en la evaluación macroscópica, microscópica y en los estudios de biología molecular.

1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA

En primer lugar, se cuantifico la evolución del diámetro de las articulaciones traseras de las ratas durante el desarrollo del modelo con un calibre digital, según se indicó en *Materiales y Métodos*. Estas medidas demostraron que las rodillas inyectadas con OLI mostraban mayores signos inflamatorios que sus rodillas control contralaterales. Como se muestra en la **figura 61**, la diferencia en el incremento del diámetro articular alcanzada fue significativa en todas las

determinaciones realizadas (días 2, 5 y 6 vs. día 0). Aunque el mayor incremento en las articulaciones inyectadas con OLI se obtuvo en el día del sacrificio de los animales (1.81 ± 0.66 en la articulación inyectada con OLI vs. 0.93 ± 0.36 en la articulación control contralateral). Esta diferencia también fue significativa y de mayor magnitud en las articulaciones inyectadas con LPS vs. sus rodillas control contralaterales.

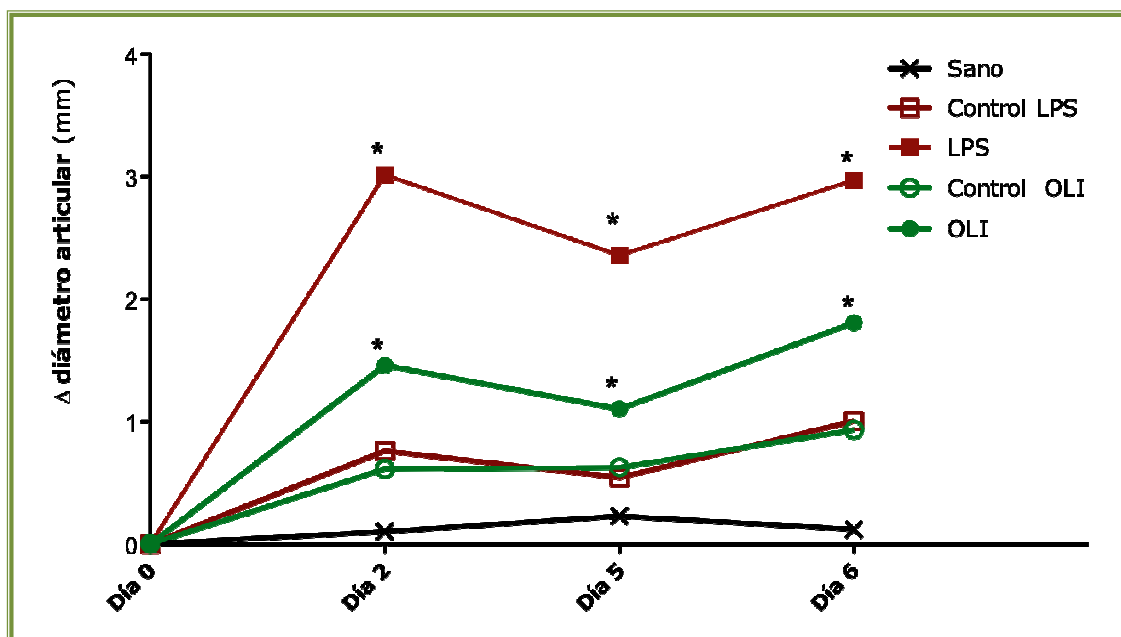


Figura 61: Evolución del diámetro articular durante el desarrollo del modelo. El diámetro de las articulaciones se cuantificó con un calibre digital en los días 0, 2, 5 y 6 (día del sacrificio) en todos los grupos de animales: sanos (no recibieron inyección intraarticular); LPS, articulación izquierda inyectada con LPS y control contralateral con su vehículo (control LPS); y OLI, articulación izquierda inyectada con OLI y control contralateral con su vehículo (control OLI). La gráfica muestra el incremento del diámetro articular vs. el día 0 (comienzo del modelo), y representa la media \pm EE de 15 articulaciones (* $p \leq 0.05$ vs. su articulación control contralateral).

La **figura 62**, muestra unas fotografías representativas del aspecto macroscópico de las articulaciones en cada uno de los grupos experimentales. En la fotografía correspondiente a un animal sano se observa la fascia de un color blanquecino normal. Sin embargo, en la articulación inyectada con LPS se aprecia un mayor volumen articular con un tejido de color amarillento y un aura alrededor de ella que apunta a un engrosamiento del tejido sinovial. Por el contrario, en la articulación control de LPS el volumen articular es claramente menor y no se observa ese aura blanquecina alrededor de la fascia. Finalmente, la articulación inyectada con OLI muestra un mayor volumen articular con la presencia de un engrosamiento sinovial, que no se detecta en su control contralateral.

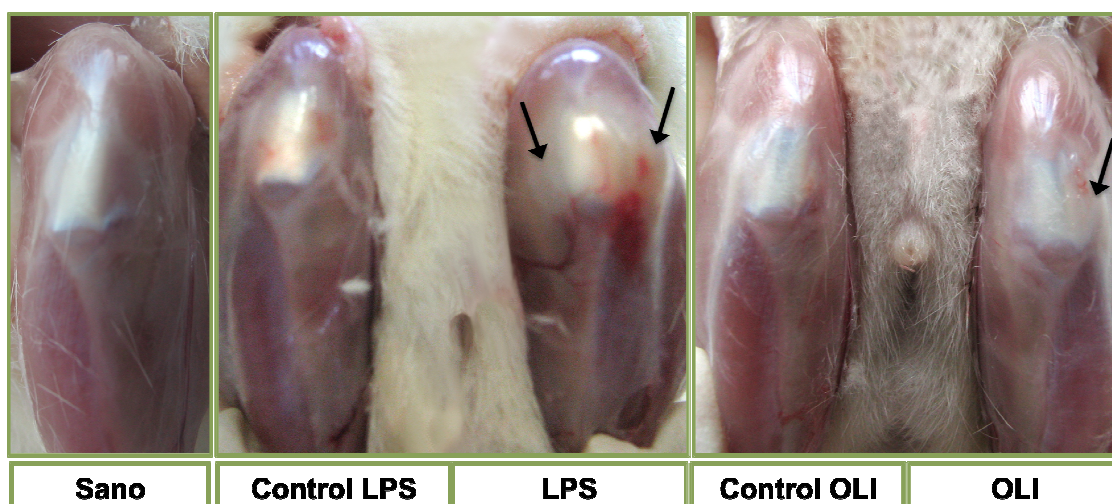
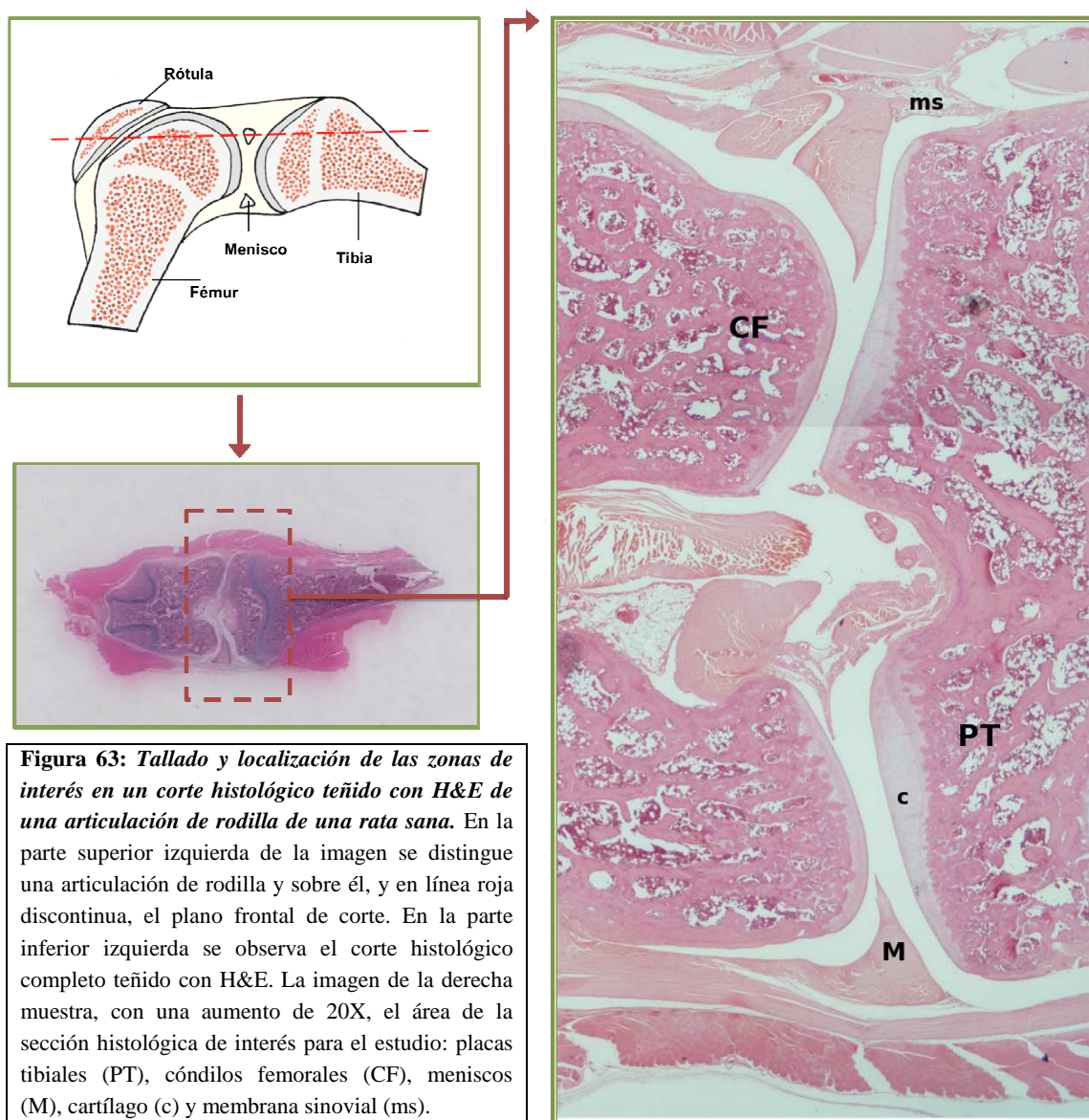


Figura 62: Macroscopía de la articulación cerrada de la rodilla de los animales en el momento de su sacrificio. Tras el sacrificio de los animales, las articulaciones traseras se dejaron al descubierto retirando la capa cutánea que las recubría, pudiéndose observar más claramente el aspecto macroscópico. Fotografías representativas de las articulaciones de los 3 grupos de animales: sanos (no recibieron inyección intraarticular); LPS, articulación izquierda inyectada con LPS y control contralateral con su vehículo (control LPS); y OLI, articulación izquierda inyectada con OLI y control contralateral con su vehículo (control OLI). Marcado con una flecha se indican las zonas de engrosamiento en la cápsula articular.

En resumen, la inyección de OLI en la cavidad articular de rodillas de rata induce un incremento en su diámetro articular, con una respuesta inflamatoria ya detectable a nivel macroscópico.

2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA

La presencia de inflamación y destrucción articular se evaluó microscópicamente en secciones de rodillas teñidas con las técnicas convencionales Hematoxilina-Eosina (H&E), Tricrómico de Masson y Safranina O-Verde luz. En la **figura 63** se muestra como se realizó el tallado de la articulación con la orientación de los cortes histológicos resultantes, y la localización de las zonas de interés para el estudio.



Como se observa en las secciones representativas de articulaciones de rodilla teñidas con H&E de los diferentes grupos experimentales (**figura 64**), las articulaciones inyectadas intraarticularmente con OLI desarrollaron un daño tisular a nivel del tejido sinovial, con hiperplasia de la íntima y proliferación en la subíntima de infiltrado celular. Como era de esperar, en el grupo inyectado con LPS también se observó una gran afectación sinovial.

Finalmente, y con respecto al cartílago, no se detectaron grandes cambios a nivel microscópico ni en la composición ni en la estructura del mismo.

A continuación se detallan en mayor profundidad los resultados obtenidos en el análisis microscópico del cartílago y tejido sinovial.

2.1. Evaluación del daño en el cartílago

El análisis del efecto de la inyección intraarticular sobre el cartílago, se realizó con un estudio histológico semi-cuantitativo mediante tinción de los cortes histológicos con H&E, Tricrómico de Masson y Safranina O-Verde luz (consultar **tabla 11**, sección *Materiales y Métodos*). A través de este análisis se valoró la ausencia o presencia de alteraciones patológicas en la estructura, celularidad y MEC del cartílago. El cartílago procedente de las articulaciones inyectadas con OLI presentó en su gran mayoría una superficie articular lisa, sin la presencia de erosiones o pérdida de alguna de sus capas, además de una celularidad normal, similar a la de los controles contralaterales (**figura 65**). En relación a la composición de la matriz, valorada con la tinción de Safranina O-Verde luz, tampoco se observaron cambios significativos respecto de la condición control (**figura 65B**). Comentar que en uno de los animales analizados, se detectó una ligera disposición caótica en los condrocitos del cartílago de la articulación inyectada con OLI que no se detectaba en su control contralateral.

Por otra parte, el cartílago de las articulaciones inyectadas con LPS sí presentó alteraciones patológicas significativas con respecto al cartílago de los controles contralaterales (**figura 65**). De tal forma, un gran porcentaje de las articulaciones inyectadas con LPS mostraron en su cartílago una estructura ligeramente desordenada (**figura 65A**), y una pequeña pérdida de afinidad por el colorante Safranina O en las capas superficiales de la matriz, lo que reflejó una reducción del contenido de proteoglicanos en la misma (**figura 65B**). Estos cambios no se observaron o fueron de menor grado en las articulaciones contralaterales del grupo LPS. La **figura 65C** muestra los datos numéricos obtenidos en la valoración semi-cuantitativa del daño en el cartílago.

Finalmente, cabe destacar la presencia de un *pannus* invasivo que comenzaba a degradar el tejido articular en las articulaciones inyectadas con LPS (**figura 66**).

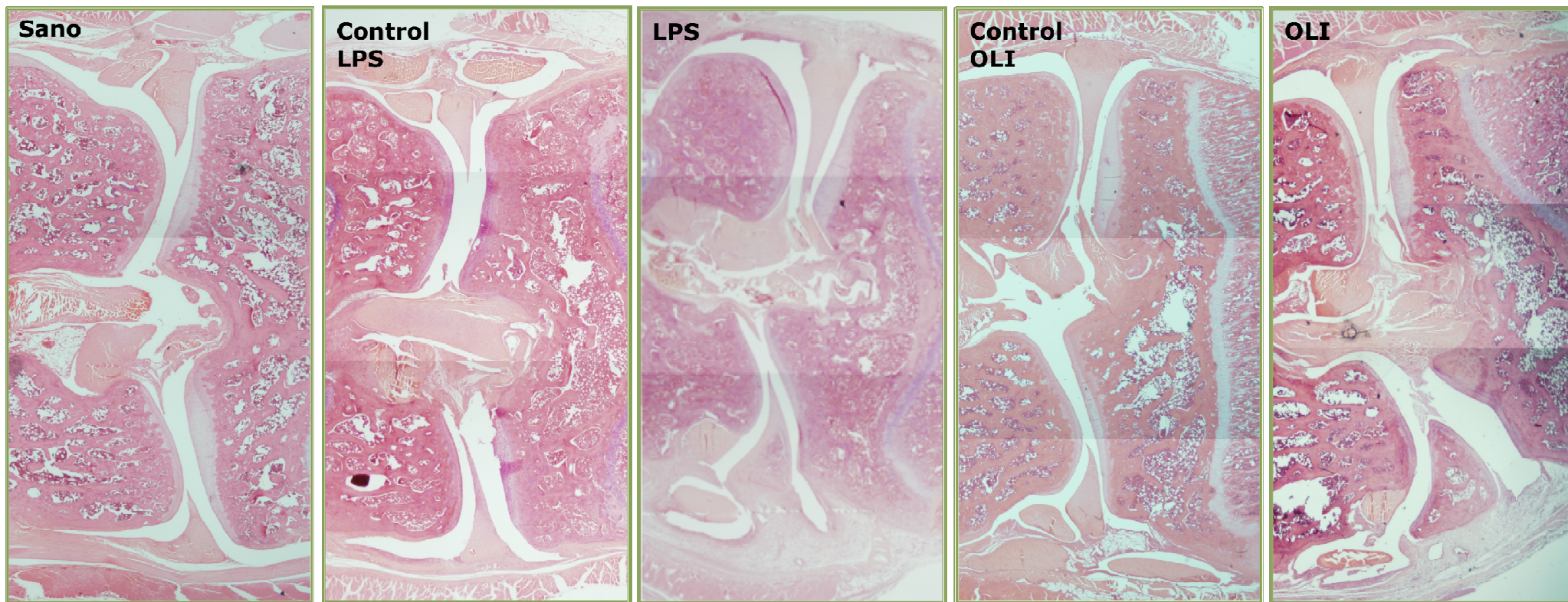


Figura 64: Histopatología de articulaciones de rodilla de rata. Imágenes representativas de cortes histológicos de rodilla teñidos con H&E de cada grupo experimental: sanos (no recibieron inyección intraarticular); inyectadas intraarticularmente con LPS o con su vehículo en la articulación control contralateral (control LPS); e inyectadas intraarticularmente con OLI o con su vehículo en la articulación control contralateral (control OLI). Imágenes con un aumento de 20X.

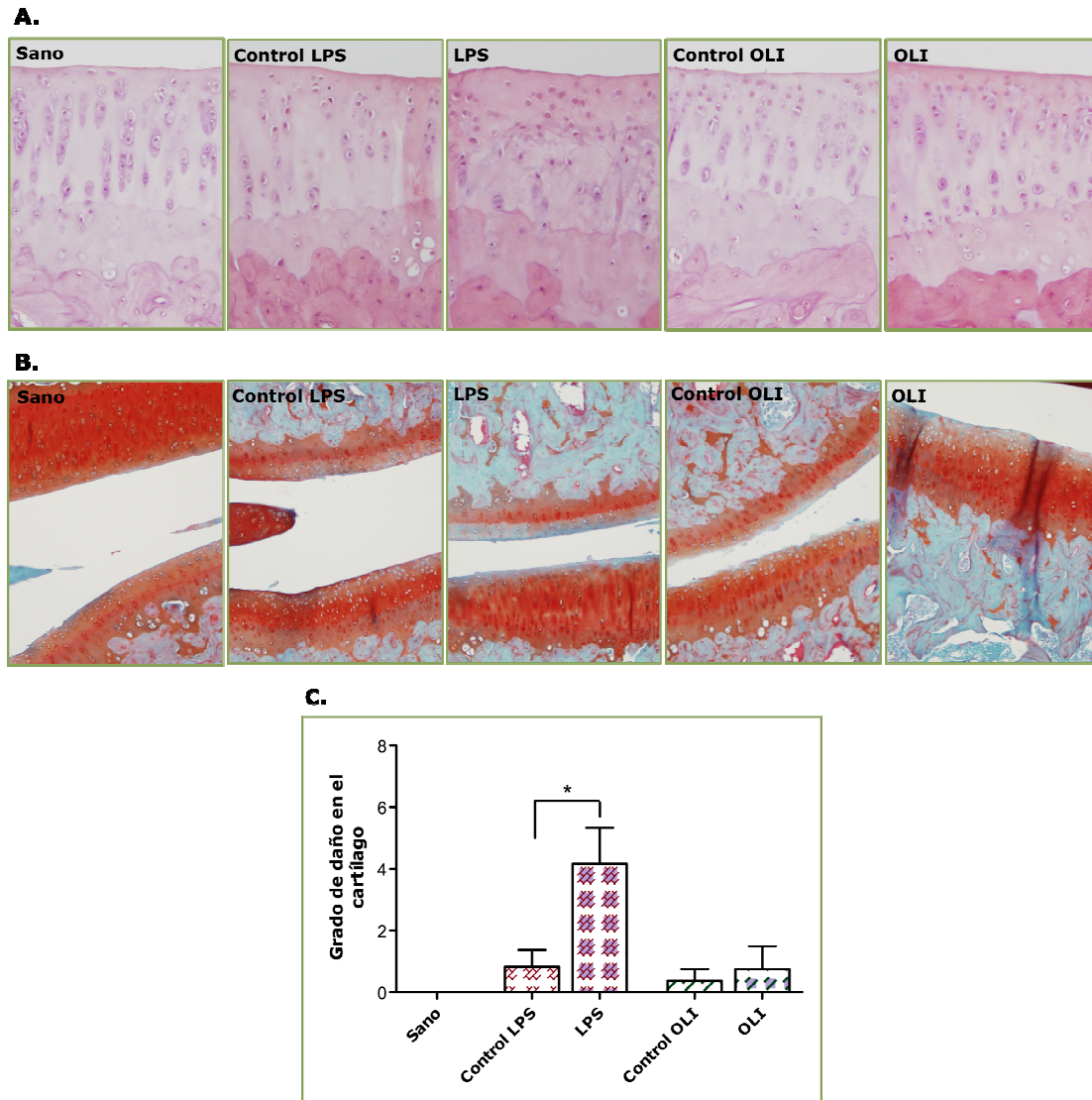


Figura 65: Evaluación del daño en el cartílago articular en rodillas de rata. Fotografías representativas de cortes histológicos teñidos con H&E (**A**) y Safranina O-Verde luz (**B**) procedentes de articulaciones de rodillas de todos los grupos: sanos (no recibieron inyección intraarticular); inyectadas intraarticularmente con LPS o con su vehículo en la articulación control contralateral (control LPS); e inyectadas intraarticularmente con OLI o con su vehículo en la articulación control contralateral (control OLI). Fotografías con un aumento de 200X (**A**) y 100X (**B**). **C.** Análisis semi-cuantitativo (consultar **tabla 11** en sección *Materiales y Métodos*) donde se evaluó la estructura, celularidad y tinción de la matriz extracelular del cartílago (con una máxima puntuación de daño de 13 puntos). La gráfica muestra el grado de daño en el cartílago y representa la media \pm EE de 8 articulaciones en cada grupo (* $p \leq 0.05$).

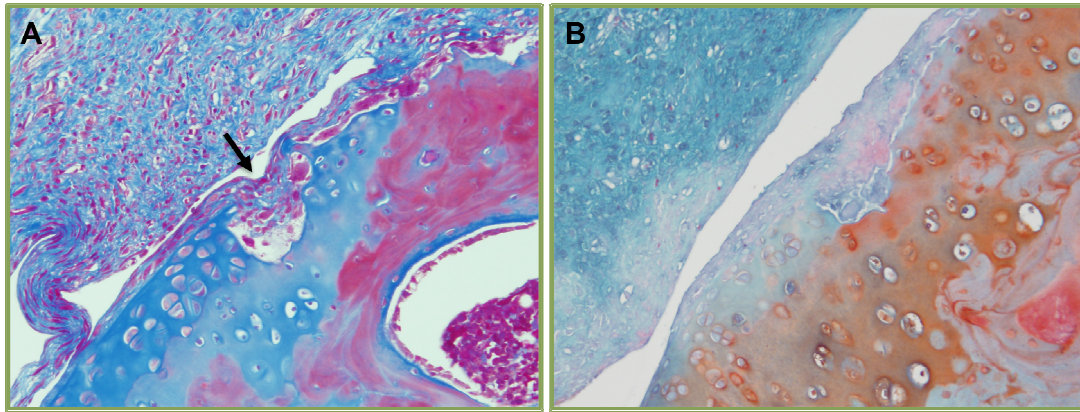


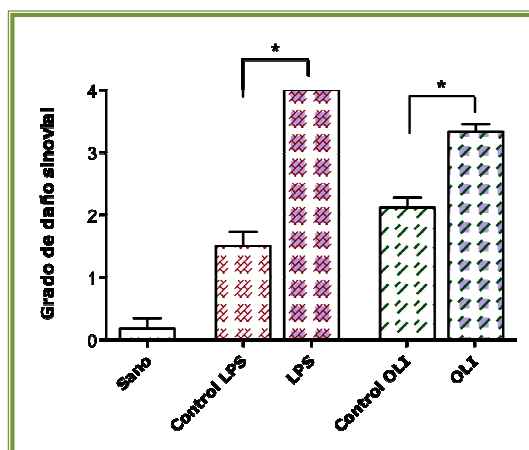
Figura 66: Pannus sinovial invasivo en una articulación de rodilla de rata inyectada intraarticularmente con LPS. **A.** Fotografía representativa de un corte histológico teñido con Tricrómico de Masson en el que se observa el *pannus* sinovial invadiendo el cartílago (señalado con una flecha). **B.** Fotografía representativa de un corte histológico teñido con Safranina O-Verde luz en el que se muestra la pérdida de afinidad por el colorante coincidiendo con la zona de cartílago invadido por el *pannus*. Imágenes con un aumento de 200X.

2.2. Evaluación del daño en el tejido sinovial

En la inflamación sinovial el daño tisular representa la suma de las lesiones de la íntima, intersticio vasculo-conectivo (subíntima) e infiltración de células circulantes, siendo la aparición de estas últimas el parámetro diferencial más significativo de una respuesta aguda. Para valorar la presencia de estos indicadores de daño se estableció un análisis semi-cuantitativo que analizó: el número de capas que formaban la íntima, la proliferación tisular de la subíntima, la presencia de células inflamatorias, y finalmente la formación del *pannus* invasivo (consultar **tabla 12**, sección *Materiales y Métodos*).

Como se muestra en la **figura 67**, tanto la inyección intraarticular con LPS, el control positivo de inflamación, como la inyección intraarticular con OLI, indujeron un daño en la sinovial significativamente mayor que en las respectivas articulaciones control contralaterales. Concretamente las articulaciones tratadas con OLI presentaron una mayor proliferación celular en la subíntima, además de un marcado infiltrado que no se localizó en las articulaciones control contralaterales (**figura 67B**).

A.



B.

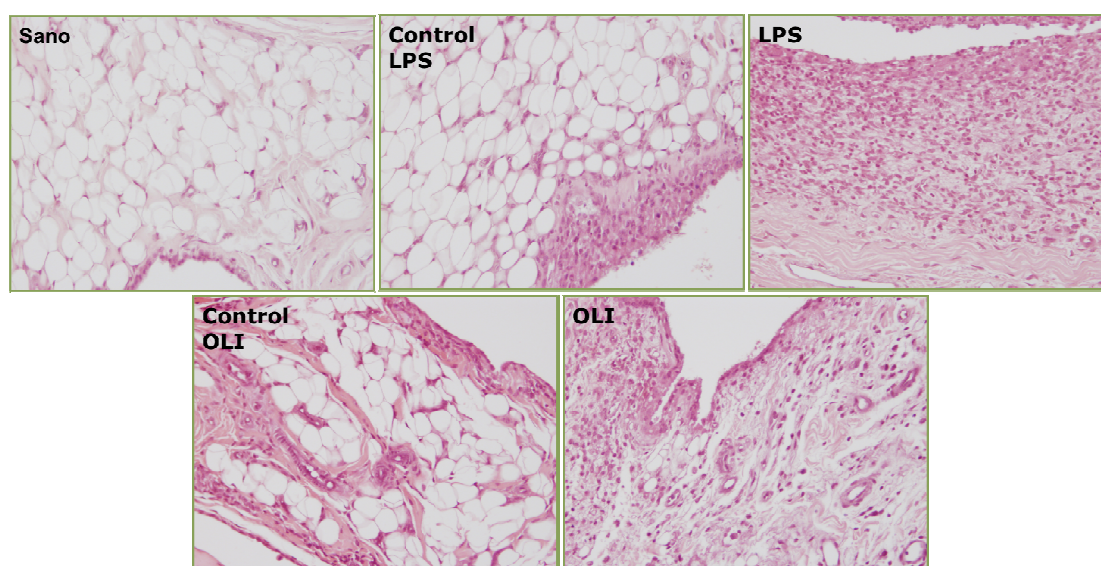


Figura 67: Determinación del grado de daño sinovial. A. El estudio se basó en un análisis semi-cuantitativo (consultar **tabla 12** en *Materiales y Métodos*) donde se evaluó el número de capas de células sinoviales, proliferación de la subíntima, y presencia de infiltrado (valorado con una escala del 0 al 4). La gráfica muestra el grado de daño sinovial y representa la media \pm EE de 8 articulaciones en cada grupo ($*p \leq 0.05$). B. Fotografías representativas de membranas sinoviales teñidas con H&E procedentes de articulaciones de rodillas de ratas sanas (no recibieron inyección intraarticular); inyectadas intraarticularmente con LPS o con su vehículo en la articulación control contralateral (control LPS); e inyectadas intraarticularmente con OLI o con su vehículo en la articulación control contralateral (control OLI). Fotografías con un aumento de 200X.

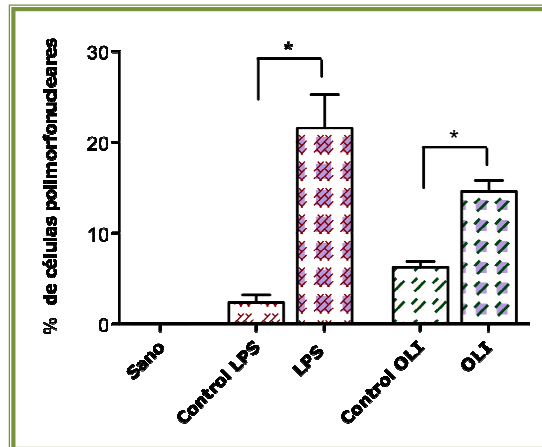
2.2.1. Análisis de la presencia de células PMN en el tejido sinovial

Dado el mayor grado de celularidad en el tejido sinovial de las muestras procedentes de las articulaciones inyectadas con OLI, y los resultados obtenidos *in vitro* que demostraban que OLI inducía la expresión de IL-8, quimioquina caracterizada por su capacidad de quimioatraer PMN, se quiso cuantificar la presencia de estas células en el infiltrado.

Para realizar esta cuantificación se emplearon los cortes histológicos teñidos con H&E procedentes de los distintos grupos experimentales. Como se ilustra en la **figura 68**, las articulaciones inyectadas con OLI mostraron en el tejido sinovial un número sustantivamente

mayor de PMN que en sus controles contralaterales. Por otra parte, se observó que el tejido sinovial de las articulaciones inyectadas con el control positivo, LPS, presentaba también un gran número de células PMN, mientras que en las articulaciones control contralaterales su presencia era prácticamente anecdótica. Estas diferencias quedaron constatadas cuando se determinó el porcentaje de células PMN que formaban el infiltrado sinovial ($13.12 \pm 1.17\%$ OLI vs. $6.55 \pm 0.99\%$ control OLI; $n=5$, $p \leq 0.05$) (figura 68A).

A.



B.

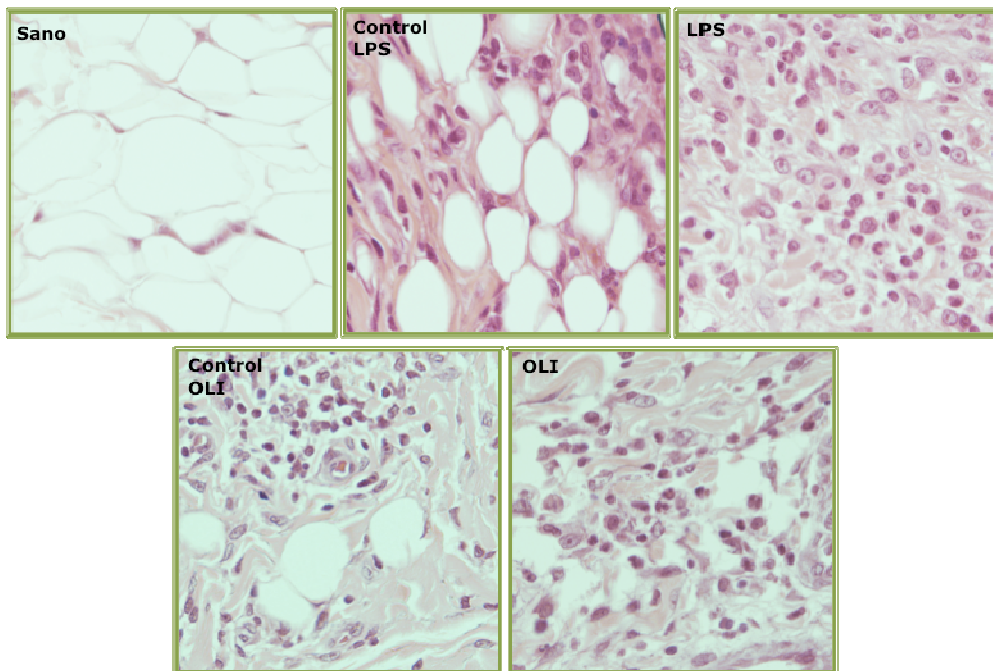


Figura 68: Evaluación del porcentaje de células PMN en el infiltrado sinovial. A. Cortes histológicos de articulaciones de ratas de los grupos: sanos, LPS, control LPS, OLI o control de OLI se tiñeron con H&E y se calculó el porcentaje de células PMN que formaban el infiltrado sinovial (según se indicó en *Materiales y Métodos*). La gráfica muestra el porcentaje de células PMN en el tejido sinovial y representa la media \pm EE de 5 membranas sinoviales en cada condición (* $p \leq 0.05$). B. Fotografías representativas del infiltrado sinovial de cortes histológicos teñidos con H&E de las articulaciones de rodillas de rata de las diferentes condiciones experimentales. Fotografías con un aumento de 400X.

El conjunto de estos resultados nos permite concluir que OLI induce una respuesta patológica en la articulación, si bien no detectable microscópicamente a nivel del cartílago, al menos al tiempo evaluado, si claramente visible en la sinovial. Esta respuesta se caracteriza por una hiperplasia e hipertrofia del tejido, además de un incremento en el infiltrado inflamatorio de células PMN.

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN INFLAMATORIA EN LOS TEJIDOS ARTICULARES

3.1. Expresión de mediadores inflamatorios en el cartílago articular

En primer lugar, se valoró la expresión génica de diversos mediadores inflamatorios [IL-1 β , TNF- α , quimioatrayente de neutrófilos inducido por citoquina 1 (CINC-1), y ligando de quimioquina C-C 2 (CCL-2)] en el cartílago de las articulaciones de los animales de cada condición experimental. Como se observa en la **figura 69**, los niveles de expresión del ARNm de IL-1 β , CINC-1 y CCL-2 estaban aumentados en el cartílago de las articulaciones inyectadas intraarticularmente con OLI, aunque estas diferencias únicamente fueron significativas frente a su control contralateral para la expresión de CINC-1, un equivalente murino de la IL-8 humana. Por otra parte, y como era de esperar, las articulaciones inyectadas con LPS mostraron incrementada la expresión de todos los mediadores analizados, logrando la significación para los genes IL-1 β y CINC-1.

Para confirmar a nivel proteico los resultados obtenidos en la expresión génica de CINC-1, se extrajeron y cultivaron explantes de cartílago de las articulaciones inyectadas con OLI y de sus controles contralaterales, y transcurridas 24 horas se valoró la liberación espontánea de esta quimioquina en el tejido como se describe en *Materiales y Métodos*. Este análisis demostró que el cartílago procedente de las articulaciones de ratas inyectadas con el inhibidor mitocondrial liberaba mayores niveles de CINC-1 que el de aquel extraído de sus rodillas contralaterales (**figura 70**).

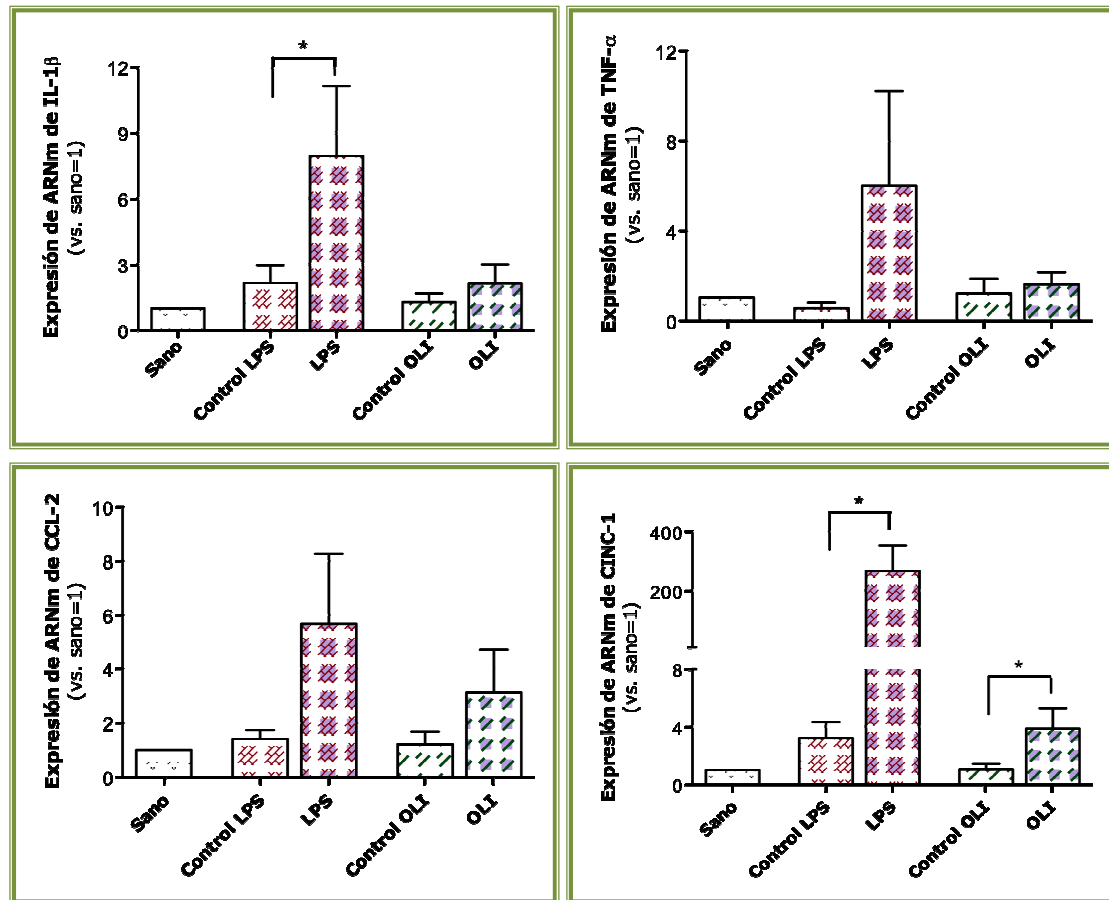


Figura 69: Expresión génica de mediadores inflamatorios en el cartílago articular. El ARNm procedente del cartílago articular femoral y tibial de las ratas se extrajo y retro-transcribió como se indicó en *Materiales y Métodos*. A continuación, la expresión de diversos mediadores inflamatorios se examinó mediante PCR a tiempo real. La gráfica muestra el ratio de expresión (basal=1), y representa la media \pm EE de 5 muestras de cartílago por cada condición por duplicado (* $p \leq 0.05$).

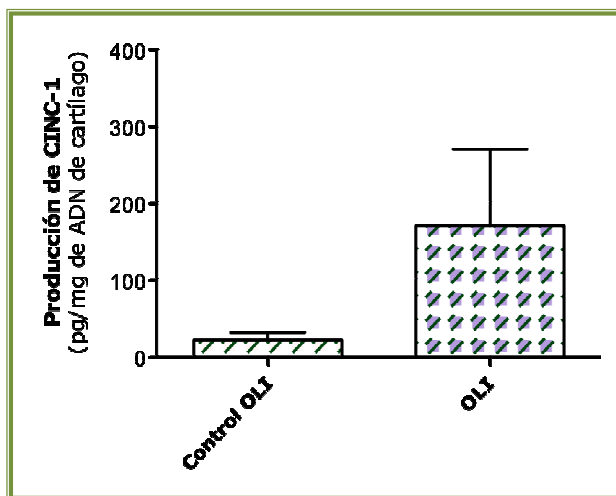


Figura 70: Producción de CINC-1 en explantes de cartílago de rata. Los explantes de cartílago de articulaciones de ratas inyectadas con OLI o de sus articulaciones control contralaterales se cultivaron durante 24 h como se indicó en *Materiales y Métodos*. Transcurrido este tiempo, se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la producción de CINC-1 mediante ELISA. La gráfica muestra los pg de CINC-1 liberados por mg de ADN de cartílago y representa la media \pm EE de 4 experimentos independientes.

3.2. Localización de IL-8 en el tejido sinovial

Dada la mayor presencia de PMN en el tejido sinovial de las articulaciones inyectadas con OLI, y puesto que IL-8 es el principal factor quimiotáctico responsable del reclutamiento de células PMN a la membrana sinovial, se determinó la presencia de esta quimioquina en el tejido sinovial por inmunohistoquímica. Como se muestra en la **figura 71**, y al igual que ocurrió para la condición LPS, las articulaciones inyectadas con el inhibidor mitocondrial presentaron una señal positiva para IL-8 mayor que en las articulaciones control contralaterales. Como era de esperar, las muestras no incubadas con el anticuerpo frente la quimioquina (negativo) no presentaron ninguna señal.

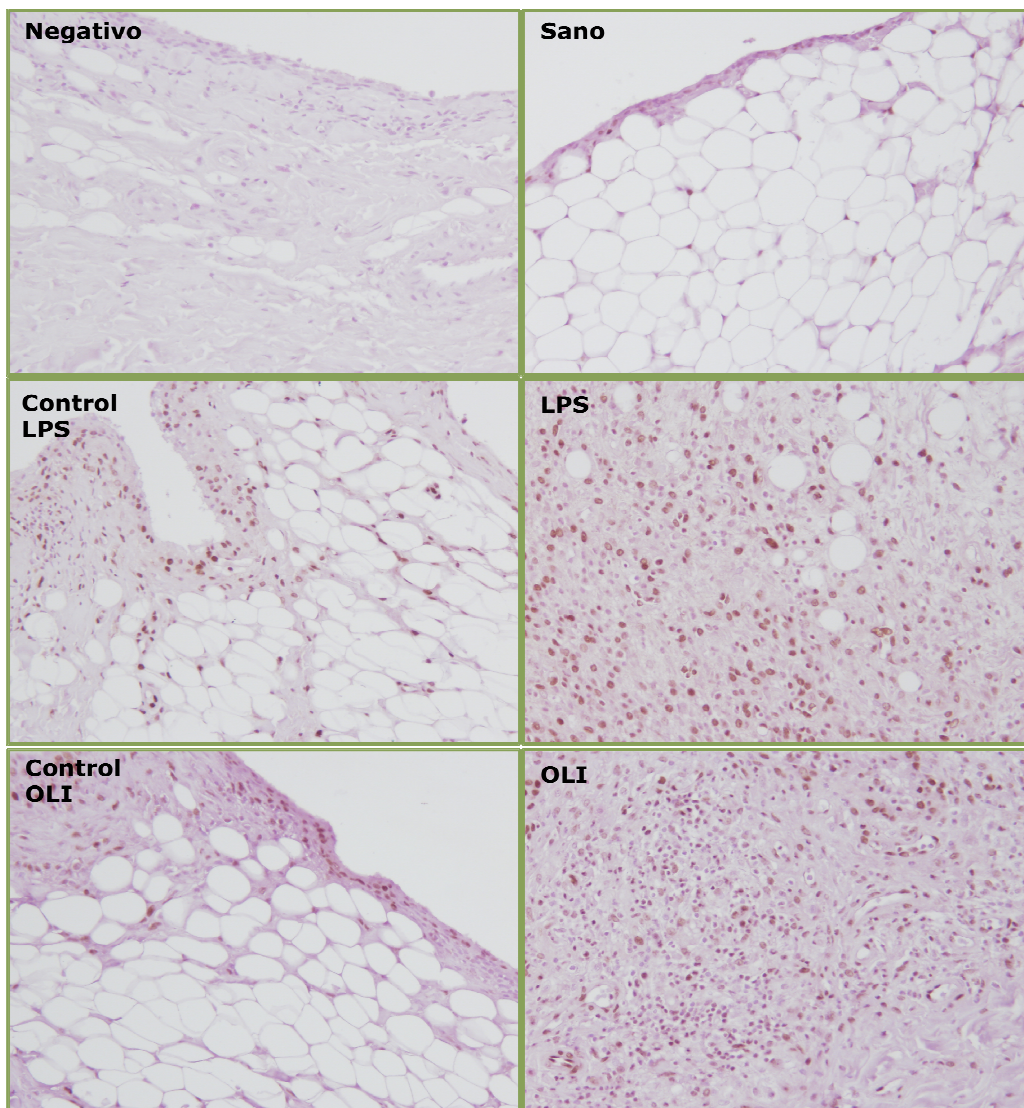


Figura 71: *Evaluación de la expresión de IL-8 en el tejido sinovial.* Se realizaron inmunohistoquímicas para IL-8 sobre cortes histológicos de articulaciones de ratas sanas, inyectadas intraarticularmente con LPS, control LPS, OLI o control de OLI. Las imágenes muestran la positividad para IL-8 (en color marrón) en el tejido sinovial de estas articulaciones. Se incluye una fotografía de un corte histológico no incubado con el anticuerpo primario (Negativo). La figura muestra fotografías representativas (200X) de inmunohistoquímicas realizadas sobre 6 articulaciones por cada condición.

Para valorar si las diferencias de expresión detectadas eran significativas, se realizó un análisis colorimétrico (señal marrón), a partir de fotografías representativas de las diferentes condiciones experimentales (más información en sección *Materiales y Métodos*). Tras este análisis, se confirmó que la inyección intraarticular de OLI o LPS aumentaba de manera significativa la expresión de IL-8 en el tejido sinovial respecto a lo que lo hacían sus controles (**figura 72**).

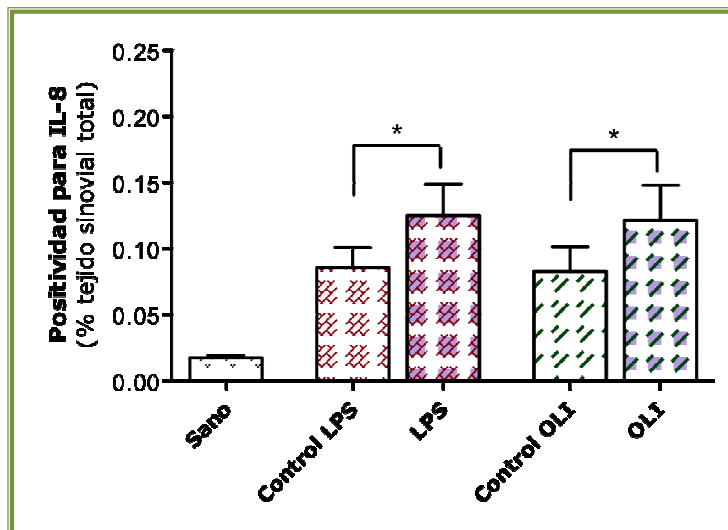


Figura 72: Cuantificación de la expresión de IL-8 en el tejido sinovial. La gráfica muestra el porcentaje de señal positiva para IL-8 (en color marrón) respecto al área total de tejido sinovial evaluado en los distintos grupos experimentales, y analizado según se indicó en *Materiales y Métodos*. Los datos representan la media \pm EE de 6 articulaciones evaluadas por duplicado en cada condición (* $p \leq 0.05$).

Estos resultados demuestran que OLI desencadena una respuesta inflamatoria en la articulación, tanto en el cartílago como en el tejido sinovial.

4. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA CRM SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN EL TEJIDO SINOVIOL

En trabajos previos en nuestro laboratorio se demostró que OLI inducía la producción de ROS en condrocitos y sinoviocitos en cultivo (Cillero-Pastor et al., 2008; Valcárcel-Ares et al., 2013). Para demostrar que la inyección intraarticular de este inhibidor mitocondrial también desencadenaba un aumento del estrés oxidativo *in vivo* en el tejido articular, se evaluaron los niveles de ROS intracelulares mediante el uso del fluoróforo, sensible a superóxido, dihidroetidio (DHE). Como se puede observar en la **figura 73**, se produjo un incremento significativo en la señal de fluorescencia en los tejidos sinoviales procedentes de

la articulaciones inyectadas con OLI; y por tanto, una mayor concentración de los niveles de ROS en estos tejidos. En la **figura 74** se muestran unas imágenes representativas de los resultados obtenidos en cada condición experimental. En conclusión, la inyección intraarticular de OLI induce un aumento del estrés oxidativo en la articulación.

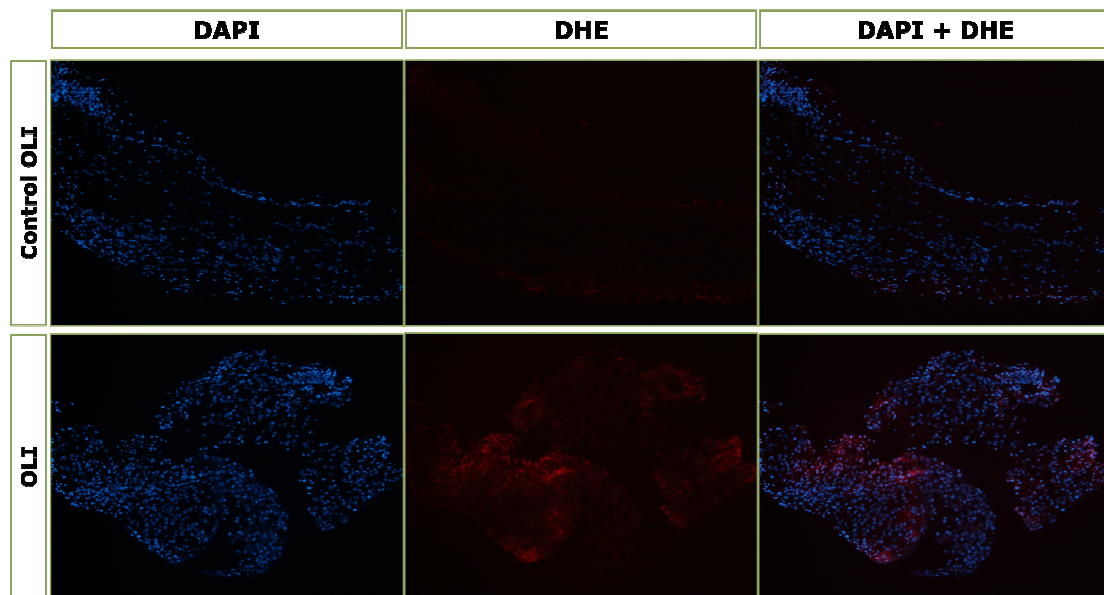
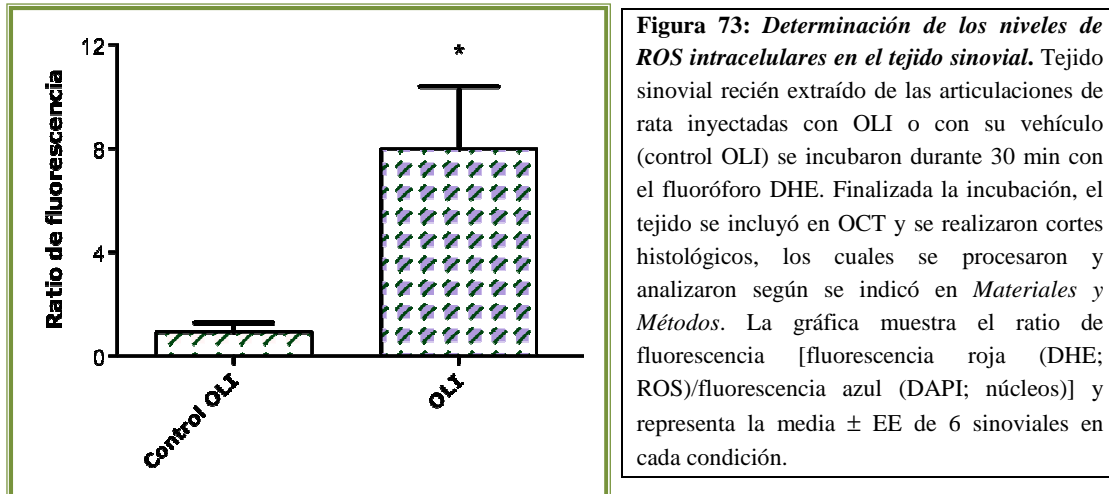


Figura 74: Imágenes representativas de los niveles de ROS detectados en el tejido sinovial. Imágenes representativas del tejido sinovial de una articulación inyectada con OLI (fila inferior del montaje) o con el vehículo (control contralateral; fila superior) de un total de 6 analizadas procedentes de 6 animales distintos. La fluorescencia azul se corresponde con los núcleos celulares teñidos con DAPI (columna izquierda) y la fluorescencia roja representa la señal de ROS obtenida con DHE (columna central). En la columna de la derecha se observa la combinación de ambos marcajes. Fotografías a un aumento de 100X.



V.

DISCUSIÓN

Imagen obtenida de <http://www.flickr.com/photos/resetreboot/2187546086/sizes/o/in/photostream/>

La artrosis (OA) es una enfermedad articular degenerativa asociada al envejecimiento, que afecta al 70% de la población mayor de 65 años, siendo la causa más común de incapacidad en personas de edad avanzada (<http://ser.es>). En la última década se han publicado numerosos datos que señalan el papel decisivo que la mitocondria desempeña en la patología artrósica (Blanco et al., 2011; Mobasheri, 2013). Por ello, múltiples estudios han centrado sus esfuerzos en el análisis de la contribución de este orgánulo en el inicio y evolución de la OA debido a su función crucial en el suministro de energía, metabolismo celular, homeostasis del Ca^{2+} y estrés oxidativo. En este sentido, la disfunción mitocondrial puede afectar a varias de las vías patológicas implicadas en la degradación del cartílago, destacando la respuesta defectuosa del condrocito al crecimiento y a la biosíntesis de la MEC, el estrés oxidativo, el incremento de la apoptosis en el condrocito, la calcificación de la matriz del cartílago; así como, un incremento de la respuesta inflamatoria y catabólica de la MEC. Por otra parte, la importancia de la inflamación en la patología de la OA ha adquirido importantes nuevas dimensiones (Berenbaum, 2013). Por todo ello, en el desarrollo de esta tesis se profundiza en el papel que la mitocondria puede desempeñar en el perfil inflamatorio que define la fisiopatología artrósica, desde dos enfoques diferentes. El primero de ellos, analiza el efecto *in vitro* de la disfunción mitocondrial en el condrocito sobre la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas. El segundo enfoque, evalúa *in vivo* en un modelo murino de daño articular si la disfunción mitocondrial puede desencadenar la respuesta inflamatoria descrita *in vitro*.

A. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DISFUNCIÓN DE LA CRM EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA POR CITOQUINAS EN EL CONDROCITO ARTICULAR HUMANO *IN VITRO*

Tradicionalmente, los condrocitos del cartílago articular se han considerado células altamente glicolíticas, con una baja actividad de la CRM debido a la ausencia de vascularización y por situarse en un ambiente hipóxico, en relación con otros tejidos más vascularizados (Blanco et al., 2011); por ello, no se ha tenido en cuenta a la mitocondria como un elemento importante en la patogenia de la OA hasta hace relativamente pocos años. Sin embargo, se ha descrito que los condrocitos obtienen aproximadamente un 25% del ATP vía fosforilación oxidativa (Henrotin et al., 2007). Además, y como ya se ha mencionado, alteraciones en algunas funciones mitocondriales, como la producción de ATP, la modulación de los niveles de Ca^{2+} y el estado REDOX de la mitocondria puede explicar algunos de los mecanismos que inducen la degradación del cartílago durante la OA.

En particular, se ha descrito que la actividad de los complejos mitocondriales I, II y III, y el potencial de membrana mitocondrial están disminuidos en el condrocitos artrósico en

relación con el condrocito normal. Sin embargo, la actividad de la citrato sintasa, un marcador de masa mitocondrial, se encuentra incrementada en los condrocitos de donantes con OA. Esta circunstancia puede significar un intento de los condrocitos de compensar el déficit energético (Maneiro et al., 2003). En esta línea, Johnson et al. (2000; 2004) ha descrito *in vitro* e *in vivo*, en un modelo espontáneo de artrosis, que una reducción sustancial en los niveles de ATP mitocondrial contribuye a la patogénesis de la OA. También ha sido publicado recientemente que los condrocitos artrósicos sufren una disminución en su capacidad de reparar y mantener la integridad del ADNmt (Grishko et al., 2009). Asimismo, en un trabajo realizado por nuestro grupo, se ha demostrado la influencia del polimorfismo mitocondrial J en tener un menor riesgo de desarrollar OA de rodilla o ralentizar su evolución; además de modular los niveles séricos de biomarcadores en los pacientes artrósicos (Rego-Pérez et al., 2008; 2010). También se han detectado diferencias en el perfil proteico mitocondrial entre condrocitos normales y artrósicos, con una reducción en los niveles de la enzima anti-oxidante SOD2 en la condición patológica (Ruiz-Romero et al., 2009). En esta misma línea, cabe destacar el trabajo de Gavrilidis et al. (2013) mostrando como una depleción en los condrocitos de los niveles de esta enzima induce un incremento en el daño oxidativo y una disfunción mitocondrial. Además, mediadores claves en el desarrollo de la patología artrósica, como son las citocinas IL-1 β y TNF- α o el radical libre NO modulan la actividad de algunos complejos de la CRM en condrocitos y sinoviocitos *in vitro* (Cillero-Pastor et al., 2011; Kim et al., 2010; López Armada et al., 2006b; Maneiro et al., 2005). Por lo tanto, una de las premisas en que se basa nuestro estudio, es que el daño mitocondrial puede desempeñar un papel significativo en la patogénesis de la OA (Blanco et al., 2011; Roach, 2008; Terkeltaub et al., 2002).

Otra premisa fundamental en que se basa este trabajo, es que la inflamación participa de forma claramente activa en la progresión de la OA (Abramson et al., 2004; Berenbaum, 2013; Goldring et al., 2011). Como se comentó en la introducción, tradicionalmente la OA no se ha tenido en cuenta como una patología inflamatoria; sin embargo, se ha demostrado que la destrucción del cartílago en la OA es la consecuencia de la acción de citoquinas, quimioquinas y otros mediadores inflamatorios, revelando la importancia de la inflamación en la patología artrósica.

Integrando ambas premisas, en los últimos años diferentes estudios han establecido una conexión entre la disfunción mitocondrial y la inflamación (Escames et al., 2012; Krysko et al., 2011; López-Armada et al., 2013; Zhang et al., 2010a). No hay duda de que la mitocondria, al ser la fuente principal de ROS, actúa como el árbitro primordial en los mecanismos de defensa contra la infección y agentes dañinos. Sin embargo, si este proceso se desregula como consecuencia de un daño en la mitocondria, por ejemplo un exceso de mutaciones en el ADNmt, se puede originar un exceso de O²⁻ y el estrés celular generado puede no ser resuelto de forma

efectiva. En particular, nuestro grupo ha demostrado recientemente que la disfunción mitocondrial *per se* genera un proceso inflamatorio y de degradación de la matriz de bajo grado en condrocitos humanos normales en cultivo (Cillero-Pastor et al., 2008; 2013). Sin embargo, si la preexistencia de la disfunción mitocondrial descrita en el condrocito artrósico (Maneiro et al., 2003) intensifica la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas permanecía sin responder.

En base a todos estos antecedentes, el objetivo de este apartado de la tesis se centro en evaluar el potencial de la disfunción mitocondrial en amplificar la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas en condrocitos normales en cultivo. Para ello, se emplearon inhibidores mitocondriales de los complejos respiratorios III y V empleados habitualmente en la bibliografía (Chowanadisa et al., 2010; Guidarelli et al., 2007; Milner et al., 2007). Los resultados obtenidos constituyen la primera evidencia de que la inhibición mitocondrial en condrocitos humanos normales en cultivo intensifica la producción de los mediadores inflamatorios IL-8, COX-2 y PGE₂ en respuesta a citoquinas a través de la generación de ROS, y de la activación del factor de transcripción NF-κB; así como de la activación de las caspasas. Además, también se describe como el resveratrol puede reducir de forma significativa esta respuesta inflamatoria.

IL-8 y PGE₂ son dos mediadores inflamatorios que están sobreexpresados en el tejido articular en diferentes patologías reumáticas (Amin et al., 1997; Cecil et al., 2005; Li et al., 2009; Vergunst et al., 2005); así como en otras enfermedades inflamatorias relacionadas con la edad, como son el Alzheimer, cáncer o arterioesclerosis. En este sentido, se ha descrito que explantes de cartílago de pacientes con OA cultivados *ex vivo*, liberan y expresan de forma espontánea 50 y 15 veces más PGE₂ y ARNm de IL-8, respectivamente, que los de individuos sanos (Amin et al. 1997; Attur et al., 2002). Este aumento en la expresión podría ser secundario a la activación de citoquinas inflamatorias (Attur et al., 1998; Sandell et al. 2008), pero también consecuencia de una activación independiente de citoquinas (Nah et al., 2008; Tetlow y Woolley, 2006; Vickers et al., 2006). En relación a esta segunda posibilidad, y como ya se ha mencionado, nuestro grupo ha demostrado que la inhibición de la actividad de la CRM induce un leve pero significativo incremento en la expresión de COX-2 y producción de PGE₂ en condrocitos humanos normales en cultivo (Cillero-Pastor et al., 2008).

En este estudio, cuando la disfunción mitocondrial fue inducida en condrocitos normales en cultivo mediante el uso de inhibidores químicos del complejo III y V (antimicina A y oligomicina, respectivamente), se observó un ligero, pero significativo aumento en la expresión del ARNm y de la proteína de IL-8. Además, este incremento fue dosis- y tiempo-dependiente. En un intento de reproducir el escenario más similar al que existe *in vivo*, algunos estudios se realizaron en explantes de cartílago, manteniendo de esta forma el condrocito sus interacciones con los diferentes elementos que constituyen la MEC (Mathy-Hartert et al., 2009;

Sandell et al., 2008). Como era de esperar, la oligomicina también incrementó significativamente la producción de IL-8 liberada por el tejido. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en láminas de pulmón humanas, donde un daño mitocondrial inducido por inhibidores farmacológicos de la oxidación de ácidos grasos generó un incremento en la expresión génica y proteica de IL-8 (Vickers et al., 2006). La disfunción mitocondrial también puede inducir la liberación de PGE₂ a través de 4-hidroxinonenal, un producto final de la peroxidación lipídica, que se produce de forma abundante en el tejido articular artrósico y que recientemente se ha identificado como un potente factor catabólico en el cartílago OA (Vaillancourt et al., 2007). De hecho, el 4-hidroxinonenal induce la expresión de COX-2 y la liberación de PGE₂ en condrocitos humanos artrósicos (Vaillancourt et al., 2007).

Para examinar la posible implicación del deterioro mitocondrial en el incremento de la sensibilidad de las células a la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas, se evaluó si la inhibición de la CRM en el condrocito elevaba los niveles de producción de IL-8 y PGE₂ inducidos por las citoquinas IL-1 β y TNF- α . Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que IL-1 β y TNF- α son las principales citoquinas catabólicas y pro-inflamatorias involucradas tanto en el inicio como en la progresión de la destrucción del cartílago articular (Martel-Pelletier et al., 2008). Además, el incremento en los niveles de enzimas catabólicas, prostaglandinas, ROS, NO, y otros marcadores están asociados a niveles elevados de estas dos citoquinas en fluidos y tejidos articulares de pacientes artrósicos (Mueller y Tuan, 2011). En este trabajo, el tratamiento de condrocitos humanos normales con antimicina A u oligomicina amplificó de forma sinérgica la respuesta inflamatoria inducida por las citoquinas IL-1 β y TNF- α . Concretamente, se observó que la disfunción mitocondrial incrementó la expresión de IL-8, así como la actividad quimiotáctica inducida por estas citoquinas sobre PMN. Además, también se detectó un efecto amplificador similar sobre COX-2 y su producto enzimático final la PGE₂.

Estos hallazgos están en concordancia con aquellos obtenidos por otros investigadores que demostraron también que la disfunción mitocondrial aumentaba la respuesta inflamatoria inducida por diferentes estímulos catabólicos. En células epiteliales de pulmón la preexistencia de una disfunción mitocondrial inducida por oligonucleótidos frente a la proteína II del núcleo de la reductasa de ubiquinol-citocromo c del complejo III de la CRM, incrementó la generación de ROS mitocondriales y potenció la acumulación de células inflamatorias en las vías respiratorias inducida por extractos de polen (Aguilera-Aguirre et al., 2009). De notable interés, es el hecho que estudios recientes también revelan que PGE₂ promueve la expresión de IL-1 en condrocitos articulares, amplificando de este manera el proceso de inflamación local (Li et al., 2009). A ello se suma, que estos autores también han demostrado que el tratamiento combinado de IL-1 y PGE₂ acelera de forma sinérgica la expresión de moléculas asociadas al dolor, como

la sintasa del NO y la IL-6 (Li et al., 2009). Estos hallazgos confieren una mayor relevancia a nuestros resultados en relación con los efectos de la disfunción mitocondrial.

Un gran número de evidencias señalan una relación entre los procesos inflamatorios y destructivos en la patología artrósica. Así, diferentes estudios indican que PGE₂ ejerce efectos principalmente catabólicos sobre los condrocitos artrósicos a través de inhibir la síntesis de proteoglicanos y estimular la degradación de la matriz tras la inducción de la expresión de MMP-13 (Attur et al., 2008; Iimoto et al., 2005). En relación a estos estudios, otros autores han descritos que quimioquinas como MIP-1 β , RANTES, GRO- α o IL-8 son capaces de inducir la expresión de diferentes metaloproteasas y la pérdida de proteoglicanos (Borzi et al., 2000; Merz et al., 2003). En este estudio, no valoramos la modulación de ningún marcador destructivo. Sin embargo, y en concordancia con trabajos previos de Lotz et al. (1992) y Vam Damme et al. (1990) en condrocitos estimulados con IL-1 β , observamos que la disfunción mitocondrial incrementa la forma biológicamente activa de IL-8 capaz de atraer neutrófilos, los cuales han sido ampliamente descritos como inductores de destrucción articular (Mainardi et al., 1987; Jasin et al., 1991). Además, nuestro laboratorio previamente detectó que los mismos inhibidores mitocondriales empleados en este estudio, eran capaces de estimular la expresión de MMP-1 y MMP-3 en condrocitos normales en cultivo (Cillero-Pastor et al., 2013). Teniendo en cuenta todos estos hallazgos, el efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta destructiva del condrocito artrósico no debería ser descartada.

Oligomicina es un antibiótico natural extraído de la familia *streptomyces*, con capacidad de inhibir la ATP sintetasa mediante su unión a la proteína que confiere sensibilidad a oligomicina (OSCP) situada en el tallo periférico del complejo F₀-F₁ de la ATP sintetasa. Esta unión bloquea la conducción de protones por el canal y por tanto la síntesis de ATP mitocondrial (Cunningham y George, 1975; Kim y Berdanier, 1999). En este estudio, se quiso demostrar que los efectos detectados con este inhibidor químico del complejo V mitocondrial, se debían exclusivamente a su capacidad de bloquear la formación de ATP mitocondrial, y no a efectos secundarios de esta molécula o derivados de su toxicidad (Wallace y Starkov, 2000). Para este propósito, se silenció la expresión de OSCP con un siARN complementario a una región del ARNm que codifica para OSCP, inhibiendo así su expresión. Estos estudios se realizaron en la línea celular inmortalizada de condrocitos T/C-28a2 (Goldring et al., 1994). Estas células han sido empleadas en numerosos estudios para establecer un modelo *in vitro* reproducible y fiable, y poder evaluar los mecanismos fisiológicos y patológicos que pueden tener lugar en el cartílago articular (Lin et al., 2006; Varoga et al., 2004; Zhang et al., 2010b). Además, en gran parte de estos estudios los condrocitos fueron transfectados con diferentes ARN de silenciamiento, demostrando una gran eficacia de esta técnica en estas células (Abulencia et al., 2003; Wang et al., 2011; Zhu et al., 2010). Previamente al desarrollo de los

estudios de transfección, y con el objeto de validar que el comportamiento de las células T/C-28a2 era similar al observado anteriormente en los condrocitos de cultivo primario, se evaluó el efecto amplificador de oligomicina sobre la expresión de IL-8 inducida por IL-1 β . Como era de esperar, el efecto sinérgico entre la disfunción mitocondrial e IL-1 β fue similar al detectado previamente en el cultivo primario; sin embargo, en términos absolutos la modulación en los niveles de la quimioquina IL-8 fueron menores en la línea celular que en los condrocitos humanos de cultivo primario. Además, la estimulación con oligomicina *per se* no indujo una producción detectable de IL-8. Este hecho fue también observado por Finger et al (2003), quien detectó unos niveles de expresión de genes involucrados en la síntesis y renovación de la matriz menores en esta y otras líneas inmortalizadas de condrocitos frente a la observada en condrocitos articulares primarios, concluyendo que existe una relación inversa entre la capacidad de proliferación de la célula y los niveles de expresión de estos genes. No obstante, el cultivo de los condrocitos inmortalizados en condiciones libres de suero, como las que se utilizaron en este estudio, origina una respuesta catabólica detectable frente a estímulos como IL-1 β o TNF- α (Conde et al., 2011; Varoga et al., 2004; Zhang et al., 2010c), PGJ₂ y PGE₂ (Wang et al., 2010; Zhu et al., 2010), o condiciones de estrés (Abulencia et al. 2003; Zhu et al., 2010). Demostrada la validez de la línea celular para estos estudios, se realizaron los experimentos de transfección con siARN. Como era de esperar, el silenciamiento de la expresión de OSCP potenció la expresión de IL-8 inducida por IL-1 β en la línea celular, confirmando así la implicación de la disfunción mitocondrial en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en el condrocito.

Los resultados obtenidos en los condrocitos en cultivo primario y en la línea celular mostraron que la disfunción mitocondrial amplificó y aceleró la respuesta a citoquinas equiparándola a la inducida por estimulaciones con concentraciones de citoquinas hasta 3 veces mayores, o de tiempos de incubación más largos. Por tanto, se sugiere que un fallo mitocondrial preexistente podría reducir la concentración de citoquinas catabólicas o el tiempo necesario para observar una respuesta patológica en el condrocito. De acuerdo con estos resultados, diferentes estudios han demostrado que los condrocitos artrósicos en cultivo secretan, de forma espontánea y también inducida por citoquinas, mayores cantidades de mediadores pro-inflamatorios que condrocitos procedentes de individuos sanos (Amin et al., 1997; Borzi et al., 1999; Pulsatelli et al., 1999; Sandell et al., 2008; Yuan et al., 2001). Por destacar alguno de estos estudios, la producción espontánea de PGE₂ a partir de cartílago OA humano es notablemente mayor que la producida por cartílago normal, además la adición de citoquinas aumenta hasta 30 veces más su producción en el tejido OA, de lo que lo hacía en el normal (Amin et al., 1997). Efectos similares han sido también descritos para IL-8, así Sandell et al. (2008) observó como condrocitos procedentes de tejido artrósico sin estimular presentaban un perfil de expresión génica de quimioquinas, entre las que se encontraba IL-8, similar al de

condrocitos normales estimulados con IL-1 β 0.1 ng/ml. Además, y como una posible implicación de la mitocondria en este efecto, se ha observado que el ADNmt de condrocitos artrósicos es más sensible a los efectos dañinos ocasionados por la acción de las citoquinas IL-1 β y TNF- α , que el de mitocondrias de condrocitos normales (Kim et al., 2010). En contraste, algunos autores han señalado que los condrocitos procedentes de individuos artrósicos presentan una menor sensibilidad inflamatoria a estímulos catabólicos (Fan et al., 2005; Min et al., 2001), que los procedentes de individuos sin patología articular, obteniéndose, un mayor ratio de respuesta en estos últimos con la estimulación con IL-1 β . Sin embargo, estos hallazgos son compatibles con nuestros resultados, así como con los anteriormente descritos, ya que la mayoría de ellos demostraron en la condición artrósica una mayor producción de mediadores catabólicos en términos absolutos. Además, una posible explicación a la reducida sensibilidad a las citoquinas en estos estudios pudo ser debida a que proceden de un tejido artrósico, ya sobreestimulado *per se*, por lo que su capacidad de respuesta a estímulos catabólicos puede estar saturada.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la disfunción mitocondrial puede contribuir al fenotipo inflamatorio observado en el cartílago articular artrósico a través de la expresión de mediadores inflamatorios claves en la OA, como son la IL-8, la enzima COX-2 y su producto enzimático la PGE₂.

Mediadores de señalización

Una vez demostrada la relación entre el fallo mitocondrial y el desarrollo de una respuesta inflamatoria en el condrocito humano normal, se quiso analizar que vías estaban implicadas en este proceso. La CRM es uno de los sitios más importantes de generación de ROS, pudiéndose incrementar esta producción tras un fallo en el funcionamiento mitocondrial. El estrés oxidativo acumulado como consecuencia de la acción de estos radicales libres se ha definido como un factor clave en patologías asociadas a la edad como es la OA (Chung et al., 2009; Henrotin et al., 2007), posiblemente a través de su capacidad de activar la expresión de genes pro-inflamatorios (Loeser, 2009; Wei et al., 2009) entre los que se encuentran IL-8 y COX-2. Reforzando esta hipótesis, estudios proteómicos han determinado que un desequilibrio en el balance REDOX celular participa activamente en la patogénesis de la OA (Ruiz-Romero et al., 2008; 2009). Por otro lado, en estudios previos nuestro laboratorio ha descrito que condrocitos estimulados con antimicina u oligomicina producen grandes cantidades de ROS, desencadenando además una respuesta inflamatoria. Esta respuesta inflamatoria se reduce al utilizar el sequestrador de ROS, NAC (Cillero-Pastor et al., 2008). En el estudio actual, hemos demostrado la implicación de ROS en el efecto exacerbador del deterioro de la función mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas. A este respecto, el

pretratamiento de las células con NAC inhibió la expresión de IL-8 inducida por la sinergia entre los inhibidores mitocondriales e IL-1 β . En otros tipos celulares, la disfunción mitocondrial también incrementa la generación de ROS, resultando en la potenciación de la citotoxicidad y la acumulación de células inflamatorias (Aguilera-Aguirre et al., 2009; Li et al., 1999; Schulze-Osthoff et al., 1993). Asimismo, en células mutantes para el receptor tipo I de TNF que muestran alterada su función mitocondrial con un aumento en la generación de ROS, el bloqueo farmacológico de estos ROS mitocondriales con diferentes moléculas anti-oxidantes (entre ellas con NAC), reduce la producción de citoquinas inflamatorias inducidas por LPS (Buala et al., 2011). En la misma línea, tratamientos anti-oxidantes pueden mejorar la progresión de la enfermedad en modelos animales de OA (Nakagawa et al., 2010).

Sin embargo, NAC no bloqueó completamente la respuesta inflamatoria en nuestro modelo, sugiriendo la posible implicación de otras moléculas asociadas a daño mitocondrial, como son el ATP, las especies reactivas de nitrógeno (RNS) o el ADNmt, en el proceso inflamatorio modulado por la disfunción mitocondrial (Escames et al., 2012; Johnson et al., 2000; Krysko et al., 2011). En este punto, comentar que recientemente se ha descrito que la apoptosis y otras formas de muerte celular pueden ser inmunogénicas, como resultado de la exposición y liberación de moléculas inmunoestimuladoras. Como ya se ha mencionado, actualmente se sabe que la disfunción mitocondrial puede afectar a diversas vías de señalización implicadas en la degradación del cartílago, como son la muerte celular por apoptosis del condrocito (Davies et al., 2008; Maneiro et al., 2005), y la inflamación (Cillero-Pastor et al., 2008; Escames et al., 2012; Krysko et al., 2011; Zhang et al., 2010a). Un nexo de unión que podría conectar ambas vías puede residir en el hecho de que la disfunción mitocondrial puede promover la apoptosis promoviendo la acumulación de los denominados patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) con capacidad inmunogénica al unirse y activar los mismos receptores que los patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs); es decir, receptores específicos de membrana (TLRs) o citosólicos (NLRs; receptores tipo Nod), desencadenando así un proceso inflamatorio crónico. Algunos de estos DAMPs son los propios ROS, ATP, citocromo c, NFPs (péptidos N-formil), o ADNmt (Krysko et al., 2011; Shimada et al., 2012).

Para evaluar si en nuestro modelo de disfunción mitocondrial se estaba generando un daño celular responsable de la respuesta inflamatoria, se valoró en primer lugar el efecto de los inhibidores mitocondriales sobre la viabilidad del condrocito con un ensayo de MTT. Estas determinaciones mostraron que solo la concentración más alta de oligomicina (10 μ g/ml) y al tiempo más largo tenía un efecto sobre la viabilidad del condrocito. Además, el tratamiento de los condrocitos durante un tiempo de 72 h con la dosis de oligomicina 5 μ g/ml no provocó ninguna reducción significativa en la viabilidad del condrocito (resultados no mostrados). Por

esta razón, en los estudios de sinergia se emplearon mayoritariamente las dosis más pequeñas de los inhibidores. Estos resultados de viabilidad con el ensayo de MTT se correspondieron con los obtenidos en la tinción DAPI, donde no se observó la típica fragmentación del ADN por apoptosis. Sin embargo, sí se detectó su condensación con las dosis mayores y a los tiempos más largos, lo que sugiere que puede existir un inicio del proceso de apoptosis, no detectable a los tiempos evaluados; o bien, una apoptosis incompleta. Este hecho podría estar generando dentro del citoplasma los mencionados DAMPs. En este sentido, comentar que los receptores citosólicos NLRs actúan como sensores del estrés celular, detectando moléculas como ROS, ATP o ADNmt. La activación de estos receptores desencadena la formación del inflamasoma (NLRP3 es el más caracterizado), y la subsiguiente activación de la caspasa 1 (Escames et al., 2012), que a su vez se encarga de procesar sus dianas citoplasmáticas, entre las que se encuentran IL-1 β e IL-18, iniciando consecuentemente cascadas de señalización inflamatorias. En este estudio, la adicción de un inhibidor de la activación general de las caspasas, o específicamente de las caspasas 3/7, redujo significativamente la expresión de IL-8 y PGE₂ inducida por los inhibidores mitocondriales, conectando las vías apoptóticas e inflamatorias en el modelo de disfunción mitocondrial evaluado. En relación, otros autores han descrito que la inhibición de la actividad catalítica de la caspasa 8 bloquea de forma eficiente la expresión de IL-8 y MCP-1, además de la apoptosis, en sinoviocitos de pacientes con AR (Palao et al., 2006).

Finalmente, y en esta misma línea, destacar que la preincubación de los sobrenadantes de condrocitos estimulados con la combinación de inhibidor mitocondrial y citoquina con un anticuerpo frente a IL-8, tan solo redujo aproximadamente en la mitad su poder quimioatrayente, sugiriendo la existencia de otros factores que estén colaborando en este efecto. Reforzando esta hipótesis, Van damme et al. (1990) observó que la actividad quimiotáctica inducida en condrocitos por IL-1 β era totalmente bloqueada por un anticuerpo frente a IL-8. Ya que los DAMPs mitocondriales como los NTPs han sido descritos como moléculas con poder quimioatrayente de neutrófilos (Carp, 1982), no podemos descartar que este u otro DAMP mitocondrial pueda estar participando en el efecto quimiotáctico inducido por la disfunción mitocondrial. En resumen, en este estudio no se observaron marcadores de apoptosis o de muerte detectables bajo este modelo de disfunción mitocondrial, probablemente porque la duración del estudio no fuese lo suficientemente extensa. Sin embargo, sí que se detectó un aumento de los niveles de ROS, y la modulación de los niveles de PGE₂ y IL-8 con inhibidores de caspasas. Estos datos podrían sugerir que un daño en la mitocondria del condrocito genera la acumulación de intermediarios que finalmente desencadenan la activación de vías pro-inflamatorias.

El incremento en los niveles de estrés oxidativo puede conducir a un aumento en la regulación de factores de transcripción sensibles al estado REDOX celular. Tal es el caso de HIF (Chandel et al., 2000; Yudoh et al., 2005), AP-1 (Mendes et al., 2003b; Thyagarajan et al., 2006) o NF- κ B (Csiszar et al., 2008; Mendes et al., 2003a; Thyagarajan et al., 2006) contribuyendo por esta vía a las alteraciones en el fenotipo pro-inflamatorio observado en el tejido artrósico. En particular, este último factor de transcripción participa en la activación de la expresión de gran parte de los mediadores pro-inflamatorios activados en el condrocito artrósico, incluyendo IL-8 y COX-2 (Facchini et al., 2005; Shakibaei et al., 2008; Vuolteenaho et al., 2009). En este estudio, la modulación farmacológica de NF- κ B con BAY 11-7085, un inhibidor de la activación de este factor de transcripción, impidió significativamente el aumento en la expresión de IL-8, sugiriendo que NF- κ B puede participar en la modulación que la disfunción mitocondrial ejerce sobre la expresión de IL-8 inducida por citoquinas. Corroborando estos resultados, cuando se evaluó el efecto de oligomicina sobre la activación de NF- κ B inducida por IL-1 β se detectó un incremento de esta misma. En este sentido, resultados similares se obtuvieron en células de fibrosarcoma y musculares donde antimicina A amplificó la activación de NF- κ B inducida por TNF- α (Li et al., 1999; Schulze-Osthoff et al., 1993). Además, Ungvari et al. (2007) demostró que un incremento del estrés oxidativo inducido tras un fallo en la función mitocondrial, incrementaba la activación endotelial de NF- κ B, contribuyendo de esta manera a las alteraciones del fenotipo pro-inflamatorio en el sistema vascular asociadas a la edad.

Otro aspecto importante a subrayar, es que NF- κ B y el previamente mencionado inflammasoma NLRP3 pueden ser activados por diferentes DAMPs mitocondriales, desencadenando una sobrestimulación de la respuesta inflamatoria (Escames et al., 2012). Este hecho podría conferir una mayor relevancia fisiológica a los resultados de sinergia obtenidos en este trabajo con la disfunción mitocondrial. Las mitocondrias dañadas suponen una importante fuente de DAMPs; por este motivo, la célula para prevenir su acumulación e inhibir la activación de vías inflamatorias, activa la autofagia. En este sentido, se ha publicado que la autofagia es deficiente en el cartílago OA (Caramés et al., 2010), y que la activación farmacológica de la misma puede suponer una aproximación terapéutica eficiente en el tratamiento de esta enfermedad (Caramés et al., 2012).

Nuevamente, no podemos dejar de citar que otros factores de transcripción sensibles al estado REDOX u otras vías de regulación post-transcripcionales, podrían también estar involucradas en la respuesta inflamatoria descrita (Rasheed et al., 2011; Wruck et al., 2011). En este sentido, comentar que la expresión de IL-8 y COX-2 es controlada a diferentes niveles pudiéndose ser una de ellas a través de la regulación de la estabilidad del ARNm mediada por cascadas de señalización activadas por p38 (Hoffmann et al., 2002; Ramsay et al., 2003). En

esta línea, se ha demostrado que el tratamiento de condrocitos humanos con un inhibidor de p38 bloquea la expresión de IL-8 y COX-2 inducida por diferentes estímulos (Rasheed et al., 2011; Thomas et al., 2002). En nuestro laboratorio también se demostró por citometría de flujo que el tratamiento de los condrocitos con SB 203580, un inhibidor de la activación de p38, reduce la señal de IL-8 inducida por la combinación de la inhibición mitocondrial e IL-1 β (resultados no mostrados). Además, se ha descrito que los ROS de origen mitocondrial son capaces de activar a la quinasa p38 (Emerling et al., 2005). Teniendo en cuenta estos hallazgos, y dado que la estimulación con antimicina A y oligomicina induce un incremento en la generación de ROS, es probable que mecanismos post-transcripcionales que implican la activación de p38 puedan participar en el efecto inflamatorio de la disfunción mitocondrial.

Resveratrol como agente terapéutico

Consecuencia del papel crítico que el estrés oxidativo y la inflamación ejercen en diversos procesos patológicos asociados a enfermedades degenerativas como la OA, el debate sobre la efectividad de estrategias terapéuticas empleando moléculas con capacidad antioxidante está en pleno auge (Mobasheri, 2013). El resveratrol, un compuesto polifenólico natural que se encuentra en altas concentraciones en la piel de la uva, vino tinto y frutos rojos, muestra esperanzadores resultados como agente anti-oxidante y anti-inflamatorio (Shakibaei et al., 2009; Vang et al., 2011). En modelos animales, el resveratrol protege contra enfermedades asociadas a la edad y mejora la función mitocondrial (Elmali et al., 2005; 2007). *In vitro*, esta molécula ha demostrado poseer un gran número de efectos beneficiosos en numerosos tipos celulares al reducir la activación de NF- κ B, la producción de PGE₂ y la formación de radicales libres, o inducir la biogénesis mitocondrial y proteger de la apoptosis (Dave et al., 2008; Takayama et al., 2009). En este estudio, se ha demostrado que la adición de resveratrol reduce los niveles de IL-8 y PGE₂ inducidos por la sinergia entre la disfunción mitocondrial y las citoquinas. Resultados similares han sido descritos en la línea celular de monocitos humanos U937, en donde el resveratrol inhibió la expresión a nivel génico y proteico de IL-8 inducida por forbol 12-miristato 13-acetato (Shakibaei et al., 2009). Donnelly et al. (2004) observó en células epiteliales humanas y en la línea celular A549 como el resveratrol reduce la expresión de COX-2; así como la producción de IL-8 y PGE₂. Además, este efecto es, al menos parcialmente, debido a la inhibición de la actividad de NF- κ B. A este respecto, otros autores han descrito como resveratrol inhibe diferentes respuestas catabólicas a través de la modulación de este factor de transcripción u otros como AP-1 e HIF (Shakibaei et al., 2009; Manna et al., 2000), o de la desacetilasa sirtuina 1 (Park et al., 2012). El resveratrol induce la biogénesis mitocondrial de células endoteliales tanto *in vitro* como *in vivo*, aumentando la masa mitocondrial, elevando la expresión proteica de constituyentes de la

cadena de transporte electrónica y factores de transcripción implicados en su síntesis (Csiszar et al., 2009). En condrocitos, el resveratrol mejora la función mitocondrial, recuperando la integridad de la membrana mitocondrial evaluada a través de su potencial de membrana, y previene la pérdida de biomasa mitocondrial y de producción de ATP que la estimulación con IL-1 β induce en estas células (Dave et al., 2008). En suma, los efectos y rutas sobre los que resveratrol actúa en condrocitos y otros tipos celulares son muy amplios en la literatura, por lo que es difícil evaluar a través de qué vías puede estar modulando la expresión de IL-8 y PGE₂ inducida por nuestro modelo de disfunción mitocondrial. Sin embargo, parece razonable hipotetizar que el efecto de resveratrol sea debido, al menos parcialmente, a su capacidad de reducir la sobreproducción de ROS y en consecuencia translocación de NF- κ B. Reforzando esta hipótesis, en nuestro laboratorio se demostró que el resveratrol inhibe la producción de ROS inducida en sinoviocitos por oligomicina; así como la activación de NF- κ B inducida por la sinergia entre la disfunción mitocondrial y las citoquinas (Válcarcel-Ares et al., 2013).

Por otra parte, se ha descrito que resveratrol puede modular la función o síntesis de receptores acoplados a proteínas G de quimioatrayentes, reduciendo así la quimiotaxis inducida por diferentes moléculas quimioatrayentes en leucocitos fagocitarios (Cicha et al., 2011; Cullen et al., 2007; Tao et al., 2004). Sin embargo, Tao et al. (2004) detectó que resveratrol no es capaz de reducir la migración de neutrófilos inducida por IL-8. En nuestros experimentos, resveratrol redujo la quimiotaxis de neutrófilos estimulada por el modelo de disfunción mitocondrial en combinación con citoquinas. En el estudio se demostró que este efecto era debido, al menos parcialmente, a reducir la liberación de IL-8 en los sobrenadantes del cultivo de condrocitos, pero de nuevo no se puede desechar la posibilidad de que el resveratrol todavía presente en estos sobrenadantes actúe directamente sobre los neutrófilos inhibiendo su migración.

Finalmente, señalar el uso habitual en la literatura de concentraciones de resveratrol iguales o inferiores a 100 μ M. A este respecto, en los estudios sobre el efecto de esta molécula sobre la expresión de IL-8, medida mediante citometría de flujo, se empleó una dosis de 250 μ M. La citometría de flujo es una técnica eficiente para medir la producción intracelular de proteínas, por lo que se hace necesaria la inhibición de la secreción extracelular para aquellas moléculas que son normalmente liberadas. Es por esta razón que en este trabajo, en la determinación de IL-8 por esta técnica, se empleó monensin, un inhibidor del transporte proteico intracelular que provoca la acumulación de las proteínas en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi. Sin embargo, monensin también ha sido descrito como un inhibidor de la endocitosis que afecta al potencial de membrana y al valor del pH celular. En este línea, Colin et al. (2011) demostró que monensin decrece en diferentes células cancerígenas la incorporación celular de resveratrol por endocitosis, reduciendo así la activación de MAPK

inducida por el resveratrol, y consecuentemente el efecto anti-proliferativo de esta molécula. Además, se ha observado que resveratrol puede sufrir modificaciones oxidativas dependientes del pH, influyendo así en sus propiedades anti-oxidantes (Corduneanu et al., 2006; Delmas et al., 2011). Aunque en nuestros ensayos monensin se añadió 4 horas después de la incubación con resveratrol, es posible que sufriera modificaciones en su actividad; por ello, se elevó la concentración necesaria para detectar la acción inhibitoria de resveratrol sobre la expresión de IL-8. Acorde con esta hipótesis, en los ensayos de ELISA, donde no es necesario emplear monensin, se testó una dosis menor de resveratrol (50 μ M), obteniéndose el mismo efecto modulador que con la dosis de 250 μ M.

En este estudio, el resveratrol reduce la respuesta catabólica inducida por la sinergia entre la disfunción mitocondrial y las citoquinas, inhibiendo la expresión de mediadores inflamatorios, así como la quimiotaxis sobre células polimorfonucleares. Por lo tanto, estos resultados consolidan al resveratrol como una molécula prometedora para su uso en fines terapéuticos y preventivos en la OA (Mobasheri, 2013).

En resumen, en este apartado de la tesis se ha intentado aportar un mayor soporte a la hipótesis de que un daño de la función mitocondrial podría participar en el fenotipo inflamatorio del condrocito observado en la patología artrósica. Nuestros resultados verifican que la disfunción mitocondrial por sí misma es capaz de generar una respuesta inflamatoria de bajo grado en el condrocito, y demuestran por primera vez que un deterioro en la función mitocondrial incrementa la respuesta inflamatoria del condrocito a citoquinas. Estos fenómenos podrían estar acelerando los mecanismos que contribuyen a la pérdida de la integridad del cartílago y la función articular observados con la edad y, especialmente, en la OA (**figura 75**). Además, sugerimos que estrategias terapéuticas basadas en el uso de moléculas naturales como resveratrol, no deberían ser descartadas para el tratamiento de patologías asociadas a la edad como la OA.

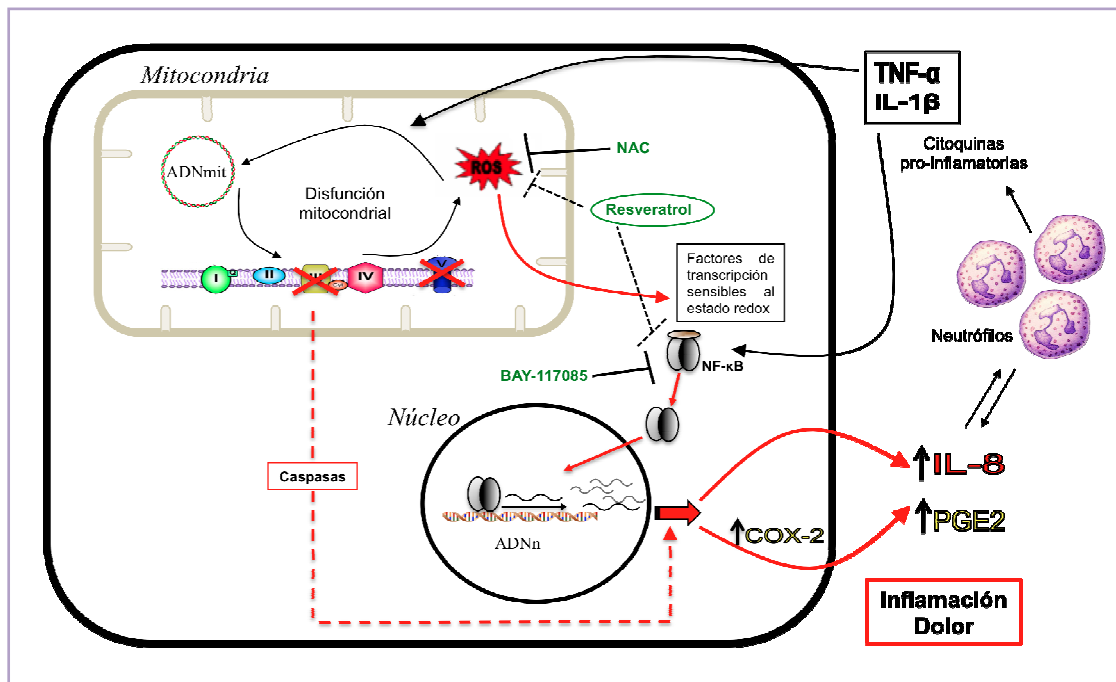


Figura 75: Ruta teórica sobre el efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria en condrocitos articulares humanos. La mitocondria, a través de la respiración, consume aproximadamente un 90% del oxígeno que se incorpora en la célula, mientras que otras moléculas de oxígeno se reducen parcialmente para formar especies reactivas de oxígeno (ROS), que en su mayoría son neutralizadas por el sistema de defensa anti-oxidante. Durante el envejecimiento se produce un incremento de estos radicales libres, que escapan del sistema de detoxificante, activando vías de señalización pro-inflamatorias sensibles al balance REDOX celular (Chung et al., 2009). De esta forma, con la edad, la articulación podría presentar un ligero incremento en los niveles de citoquinas como IL-1 β y TNF- α , que a su vez inducirían la activación de factores de transcripción como NF- κ B, con la consiguiente expresión de otros mediadores inflamatorios. De esta manera, se generaría un estado de inflamación crónica subyacente asociada a la edad. Además, y debido a mutaciones somáticas en el ADN mitocondrial (ADNmit) (principalmente debidas al daño oxidativo), a una predisposición genética (Rego et al., 2008), o la acción de mediadores pro-inflamatorios (Kim et al., 2010; López-Armada et al., 2006; Maneiro et al., 2005), se estaría generando una alteración en la función mitocondrial del condrocito. Este fenómeno junto con un estado inflamatorio crónico asociada a la edad podría acelerar y amplificar la expresión y liberación de mediadores pro-inflamatorios como IL-8, COX-2 y PGE₂, a través de incrementar la producción de ROS, la activación del factor de transcripción NF- κ B; así como la activación de caspasas. Los mediadores liberados atraen a su vez células inflamatorias a la articulación perpetuando la respuesta inflamatoria. Este ciclo de retroalimentación podría ser bloqueado a dos niveles diferentes: 1. Secuestro de los ROS liberados mediante el antioxidante NAC; 2. Inhibición de la activación de NF- κ B a través de Bay-117085. Por otra parte, resveratrol podría ejercer sus efectos anti-inflamatorios actuando sobre ambos niveles.

B. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN UN MODELO MURINO *IN VIVO* DE DAÑO ARTICULAR POR DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

Los resultados obtenidos en la primera sección de esta tesis subrayan el papel clave que el deterioro de la función mitocondrial descrito en los condrocitos artrósicos (Maneiro et al., 2003; Blanco et al., 2011; Mobasheri, 2013), puede ejercer sobre el fenotipo inflamatorio observado en estas células (Attur et al., 2002; Sandell et al., 2008). Otros estudios han analizado también el efecto que la disfunción mitocondrial tiene en condrocitos y sinoviocitos articulares, demostrando la implicación de la mitocondria en algunas de sus respuestas catabólicas (Ospelt y Gay, 2005; Johnson et al., 2000). Por ejemplo, en relación al tejido sinovial, un aumento en la mutagénesis mitocondrial está estrechamente relacionada con el incremento en la inflamación en este tejido (Harty et al., 2012). En esta línea, nuestro grupo ha demostrado que la inhibición del complejo V mitocondrial induce y potencia la respuesta inflamatoria en sinoviocitos humanos normales en cultivo (Valcárcel-Ares et al., 2013). Por otra parte, mediadores inflamatorios producidos a altas concentraciones en la mayoría de las patologías articulares, como son el NO, la IL-1 β y el TNF- α , regulan la función mitocondrial en células sinoviales y condrocitos (Cillero-Pastor et al., 2011; Kim et al., 2010; López-Armada et al., 2006). En su conjunto, estos resultados parecen evidenciar la existencia de un ciclo retro-activo de disfunción mitocondrial-inflamación.

Sin embargo, la gran mayoría de estos trabajos se han realizado *in vitro* en cultivos primarios de sinoviocitos o condrocitos articulares humanos, o bien en líneas celulares inmortalizadas de estas células. De esta manera, apenas existen estudios que evalúen el efecto directo de la presencia de un fallo mitocondrial en la articulación *in vivo*. Un estudio en esta línea es el trabajo de Johnson et al., quien describió en un modelo espontáneo de OA de rodilla en cobayas como la pérdida gradual de ATP contribuía a la patogénesis de la enfermedad. Concretamente, observaban una pérdida en la composición de la matriz articular, así como la calcificación de la misma (Johnson et al., 2004). No obstante, hasta la fecha no hay constancia de ningún otro estudio que analice el efecto directo de la inhibición mitocondrial sobre una articulación sinovial, y las consecuencias inflamatorias y destructivas que pudiera originar en el cartílago y tejido sinovial.

Por tanto, el objetivo principal de la segunda sección del trabajo fue evaluar la relevancia fisiológica de los resultados *in vitro* obtenidos en la anterior sección de la tesis. Para realizar esta aproximación se valoró *in vivo* el efecto de la inyección intraarticular del inhibidor del complejo V mitocondrial, oligomicina, en una articulación sinovial de rata. Se desarrolló para ello un modelo de daño articular agudo basado en la literatura previa (van Beuningen et al.,

1994; Scharstuhl et al., 2002). Este modelo consistió en tres inyecciones del inhibidor mitocondrial repartidas a lo largo de cinco días, siendo los animales sacrificados 24 horas después de la última inyección. Como control positivo de la respuesta inflamatoria articular, y de acuerdo a la literatura previa, se empleó LPS, un lipopolisacárido bacteriano utilizado ampliamente para inducir un daño articular agudo (Idogowa et al., 1998; Yamada et al., 2000). Con respecto a la concentración de oligomicina empleada, en cada inyección se empleó una dosis de 0.09 mg/kg del peso del animal. En este sentido, cabe destacar un trabajo previo de Kramar et al. en ratas Sprague-Dawley en el que se determinó la toxicidad de este inhibidor mitocondrial, demostrando que la inyección intraperitoneal de una dosis de 0.1 mg/kg del peso del animal, muy similar a la empleada en nuestro estudio, no produjo efectos letales, y que las funciones hepática, renal y hemodinámica no se vieron afectadas (Kramar et al., 1984). En concordancia con este estudio, se tomaron muestras de sangre de los animales de todos los grupos experimentales en el día de su sacrificio, no detectándose ningún valor hematológico ni bioquímico alterado en los análisis posteriormente realizados. De esta manera, se descartó la posibilidad de efectos sistémicos secundarios tras la inyección de oligomicina. En cuanto a la fiabilidad del uso de oligomicina como inhibidor mitocondrial en modelos *in vivo*, Kramar et al. (1984) observó que la inyección intraperitoneal de oligomicina en ratas induce una reducción en la respiración del animal. Por otra parte, y en relación a las células articulares, Johnson et al. (2000) y nuestro grupo (Valcárcel-Ares et al., 2013) hemos demostrado como esta molécula disminuye los niveles de consumo de oxígeno en condrocitos y sinoviocitos en cultivo, respectivamente.

El primer paso de este trabajo fue valorar macroscópicamente el efecto de la inyección intraarticular de oligomicina en la articulación del animal. En general, para este tipo de análisis está desaconsejado la disección de la cavidad articular, ya que alteraría la relación espacial entre tibia, fémur y tejido sinovial. Además, debido al pequeño tamaño de la articulación de la rata, determinaciones como la degeneración del cartílago articular son difíciles de valorar macroscópicamente (Gerwin et al., 2010). Aunque si es cierto que existen métodos para valorar esta misma, como es el uso de tintes que se unen únicamente a las lesiones del cartílago, estos son normalmente empleados en modelos de OA crónica (Appleton et al., 2007) ya que en modelos agudos sería difícilmente detectable. Por otra parte, la medida del diámetro articular supone una determinación macroscópica no invasiva que aporta una medida inicial fiable de la respuesta inflamatoria articular (Idogawa et al., 1998; Paquet et al., 2012). Así, tras realizar la valoración macroscópica en nuestro modelo *in vivo*, los datos obtenidos de la evolución del diámetro articular demostraron un mayor incremento en el volumen de la articulación trasera de aquellas rodillas inyectadas con LPS y oligomicina que en el de sus respectivas rodillas control contralaterales. Estos datos apuntaban a una hiperplasia del tejido sinovial que más adelante se confirmó con la medida de otros parámetros. En la misma línea, en el día de su sacrificio y tras

retirar la piel que recubre la articulación, se observó la presencia de un engrosamiento sinovial en las rodillas inyectadas con LPS y oligomicina que no se detectó en las articulaciones control contralaterales. Acorde con estos hallazgos, diferentes estudios han descrito un aumento en el diámetro articular de animales sometidos a inyecciones intraarticulares intercaladas de LPS, reflejando las respuestas patológicas que posteriormente se detectaron a nivel histológico (Idogawa et al., 1998; Otterness et al., 1994).

Una de las ventajas de la utilización de modelos murinos es que debido al pequeño tamaño de estos animales, es posible capturar la articulación entera en un sencillo corte histológico. Este hecho hace posible valorar las lesiones del cartílago, hueso y/o tejido sinovial simultáneamente en una misma imagen. Para poder evaluar estas determinaciones se han establecido una serie de análisis, en su mayoría semi-cuantitativos, de forma que se valora numéricamente la ausencia o el grado de presencia de lesiones en cada uno de estos tejidos articulares. Este tipo de análisis fue originalmente creado por Mankin en 1971 (Mankin et al., 1971), y a partir de él han ido surgiendo una serie de adaptaciones para modelos murinos y para otras especies animales. En este sentido, se ha desarrollado una iniciativa por parte del Sociedad Internacional de Investigación en Artrosis (OARSI) para establecer un consenso a la hora emplear un sistema de análisis estandarizado que asegure la uniformidad, reproducibilidad y posibilidad de comparación entre los diferentes estudios (Poole et al., 2010).

Basándonos en estas recomendaciones, se seccionaron las articulaciones en el plano frontal, la orientación más frecuente a la hora de evaluar microscópicamente los modelos de OA en rata (Gerwin et al., 2010). Y a continuación se realizaron diversas tinciones convencionales (Tricrómico de Masson, Hematoxilina-Eosina y Safranina O-Verde luz) aconsejadas para realizar las determinaciones semi-cuantitativas que valoran la integridad o el grado de lesión del cartílago y tejido sinovial en respuesta a los diferentes tratamientos.

En relación al cartílago, durante el proceso artrósico se produce un desgaste en la superficie articular con la aparición de fisuras, descenso del número de condrocitos, aparición de clústeres y alteración en la composición de la matriz entre otros, eventos que irán apareciendo a medida que el proceso patológico va progresando (Pritzker et al., 2006). Cuando se evaluó histológicamente este tejido mediante un análisis semi-cuantitativo modificado de Mankin (Pascual-Garrido et al., 2009), no se observó ninguno de estos indicadores de daño en el cartílago de las articulaciones inyectadas con oligomicina, a excepción de un caso aislado. Sin embargo, y como era de esperar (Idogawa et al., 1998; Yamada et al., 2000), el control positivo, LPS, indujo una ligera desorganización en las capas del cartílago y un cambio en la composición de la matriz que no se observó en las rodillas control contralaterales. Además, en estas articulaciones también se detectó una ligera degradación de los márgenes del cartílago, donde un *pannus* sinovial invadía el tejido. En este sentido, se ha descrito que la actividad destructiva de

LPS es mayor en los bordes del tejido, posiblemente porque el lipopolisacárido tiende a acumularse en dichas áreas del cartílago no cubiertas por los meniscos, de forma que las hace más susceptibles al daño (Otterness et al., 1994).

Una característica de presentación temprana en el cartílago artrósico es la pérdida en el contenido de proteoglicanos en las zonas superficiales del tejido, mientras que en la zona profunda su concentración puede verse aumentada o no afectada como consecuencia del incremento de su síntesis por los condrocitos de esa zona (Sandell y Aigner, 2001). A la hora de valorar el contenido de proteoglicanos y glucosaminoglucanos (GAGs) la tinción Safranina O es probablemente la tinción más empleada (Hyllested et al., 2002). Diferentes trabajos han observado que esta tinción se correlaciona con el contenido de GAGs evaluado por otras técnicas como el análisis bioquímico de cartílago marcado con el isótopo radiactivo S^{35} o la medida de la densidad de carga fijada (Jubb y Eggert, 1981; Király et al., 1996), demostrando la estequiometría de este método de detección. Sin embargo, también está descrito que esta propiedad estequiométrica deja de ser cierta cuando el contenido de GAGs en el tejido es muy bajo, como es en el caso de una OA severa o avanzada (Hyllested et al., 2002). En nuestro modelo se observó una ligera pérdida de afinidad por el colorante en las articulaciones inyectadas con oligomicina con respecto a la observada en las sanas (no inyectadas). Sin embargo, en las articulaciones control contralaterales también se produjo esta ligera pérdida, descartando así que estos efectos sean debidos a la acción específica del inhibidor mitocondrial. Por otra parte, las articulaciones inyectadas con LPS presentaban una moderada pero evidente pérdida de tinción por Safranina O, mayor que la detectada en sus correspondientes articulaciones contralaterales. En concordancia con estos resultados, Idogawa et al. (1998) observó una pérdida de coloración en el cartílago articular en un modelo similar en conejos, que consistía en tres inyecciones de LPS en intervalos de tres días a unas concentraciones comparables a las usadas en nuestro estudio. En un modelo en ratones de una única inyección intraarticular de IL-1, la depleción de proteoglicanos en el cartílago no fue suficiente para establecer un análisis semi-cuantitativo mediante su tinción con Safranina O. Sin embargo, cuando IL-1 fue inyectada en la misma rodilla tres veces con un intervalo de dos días entre inyecciones, se observó una depleción evidente en la matriz del cartílago del área femuropatelar, aunque en la zona femurotibial esta era menos pronunciada (van Beuningen et al., 1994; Yamada et al., 2000). En nuestro modelo el contenido de proteoglicanos se valoró en el área femurotibial. Este área, aunque ha sido validada para estas determinaciones, es menos sensible a estos cambios que la zona patelar, por lo que no se puede descartar la existencia de ligeras modulaciones. Acorde con esta hipótesis, Johnson et al. (2000) describió en condrocitos en cultivo primario y en células T/C-28a2 como la estimulación con antimicina A y oligomicina reducía la síntesis de proteoglicanos y colágeno. Además, en nuestro laboratorio hemos detectado que oligomicina induce en condrocitos y explantes de cartílago humanos en cultivo un

incremento en la síntesis y liberación de las enzimas destructivas MMP-1 y -3 (Cillero-Pastor et al., 2013). Por este motivo, nosotros hipotetizamos que esta degradación del cartílago se podría producir a niveles detectables si se permitiése evolucionar el modelo en el tiempo. En este sentido, Johnson et al. (2004) evaluó los cambios patológicos en el cartílago articular que tenían lugar en un modelo espontáneo de depleción de ATP en cobayas, no observando alteraciones en el mismo hasta los 4-6 meses de evolución.

Actualmente un gran número de evidencias sugieren que la inflamación presente en el tejido sinovial artrósico desempeña un papel activo en el desarrollo y progresión de la enfermedad (Berenbaum, 2013; de Lange-Brokaar et al., 2012;). Por otra parte, diferentes estudios asocian a la mitocondria con respuestas inflamatorias en el sinoviocito y tejido sinovial (Binieka et al., 2011; Da Sylva et al., 2005; Harty et al., 2012; Valcárcel-Ares et al., 2013). Por este motivo, en este trabajo también se estudió el efecto de la inyección intraarticular de oligomicina sobre el tejido sinovial. Siguiendo el análisis semi-cuantitativo recomendado por la OARSI, se valoró la respuesta patológica en el tejido sinovial de las ratas inyectadas intraarticularmente con el inhibidor mitocondrial, detectando un aumento en el infiltrado inflamatorio, concretamente de células polimorfonucleares; así como, una hiperplasia e hipertrofia de la sinovial.

Un proceso de mutagénesis en el genoma mitocondrial puede afectar a genes que codifican para proteínas de la CRM o la maquinaria mitocondrial. Este evento puede estar implicado en las llamadas enfermedades mitocondriales o participar en enfermedades inflamatorias, en el envejecimiento o en enfermedades asociadas a la edad (Escames et al., 2012; Park y Larson, 2011). En este sentido, se ha demostrado un aumento de la mutagénesis mitocondrial en el tejido sinovial procedente de pacientes con artritis inflamatoria (Harty et al., 2011). Esta mutagénesis se ha asociado a su vez con una mayor presencia de marcadores de inflamación tanto a nivel macroscópico como microscópico en este tejido, y con la producción de citoquinas pro-inflamatorias en el líquido sinovial. Concretamente, se observó una mayor vascularización del tejido sinovial, y la presencia en la subíntima de un infiltrado leucocitario mononuclear (CD68 y CD3) (Harty et al., 2011). De manera similar, en nuestro estudio se detectó por microscopía convencional que el inhibidor mitocondrial oligomicina inducía un aumento en la vascularización del tejido sinovial, y un infiltrado leucocitario en la subíntima con un alto porcentaje de polimorfonucleares. En concordancia con este hallazgo, se ha descrito como un deterioro en la función mitocondrial inducida en un modelo en ratones de isquemia/reperfusión (I/R) hepática se asocia con una respuesta aguda en la expresión pro-inflamatoria y una tardía en el infiltrado inflamatorio, siendo este fundamentalmente de neutrófilos (Mukhopadhyay et al., 2012). Además, la respuesta inflamatoria inducida por extractos de polen en un modelo de alergia en ratones, se veía potenciada tras una reducción

preexistente en la expresión de la proteína UQCBR2 del complejo III de la CRM. Concretamente, se observaba un incremento en el infiltrado de células inflamatorias de las vías áreas (Aguilera-Aguirre et al., 2009).

Respuesta inflamatoria

El siguiente paso, y teniendo en cuenta los resultados descritos *in vitro* en la primera parte de la tesis, así como hallazgos similares obtenidos en sinoviocitos (Valcárcel-Ares et al., 2013), fue evaluar el efecto de la inyección intraarticular de oligomicina sobre la expresión de mediadores inflamatorios en los tejidos articulares. En relación con el cartílago, las articulaciones inyectadas con el inhibidor mitocondrial presentaron un incremento en los niveles de expresión génica de las quimioquinas CCL-2 (equivalente murino de MCP-1 humana) y CINC-1 (equivalente de IL-8 humana), aunque estas diferencias solo fueron significativas frente a sus controles contralaterales para CINC-1. Acorde con nuestros resultados, el daño mitocondrial inducido en ratones tras un modelo de I/R hepática modula la expresión génica de las quimioquinas MIP-1 y MIP-2 (Mukhopadhyay et al., 2012). Además, en la sección anterior de esta tesis ya se describió como el inhibidor mitocondrial oligomicina incrementaba la expresión génica y proteica de IL-8 en condrocitos y explantes de cartílago humanos en cultivo. Esta quimioquina es una proteína que se secreta generalmente fuera de la célula, por lo que habitualmente se evalúan directamente los niveles de la quimioquina liberados en el líquido sinovial. Para este modelo animal de daño mitocondrial, y ante la imposibilidad de obtener volúmenes aceptables de líquido sinovial para poder realizar estas determinaciones, la evaluación de los niveles de CINC-1 secretados se realizó *ex vivo*. Concretamente, se cultivaron explantes de cartílago de las articulaciones de los animales recién sacrificados, y se valoró la secreción espontánea de CINC-1 en los sobrenadantes del cultivo. Al igual que ocurrió para la expresión génica, la cantidad de quimioquina liberada en el cartílago de las rodillas inyectadas con oligomicina era mayor que en el de sus controles contralaterales.

En este estudio, también analizamos en el cartílago la expresión génica de las principales citoquinas pro-inflamatorias implicadas en la OA, IL-1 β y TNF- α . Este análisis mostró que la expresión de IL-1 β en las articulaciones inyectadas con el inhibidor mitocondrial era mayor que en el de las articulaciones control contralaterales; sin embargo, estas diferencias no alcanzaron la significación. En contraste, oligomicina apenas moduló la expresión de TNF- α . Esta diferencia de modulación entre ambas citoquinas podría estar indicando que el condrocito responde específicamente a la situación de estrés mitocondrial promoviendo la activación de ciertas rutas metabólicas frente a otras. En este sentido, Cillero-Pastor et al. (2010) describió como IL-1 β y TNF- α inducían un perfil de expresión proteico diferente en condrocitos humanos en cultivo. Este estudio sugería además una reducción del ratio metabólico, posiblemente predisponiendo a

la respuesta apoptótica, en los condrocitos tratados con TNF- α ; así, se asociaba a esta citoquina con estadios más avanzados o severos de la enfermedad, como otros autores ya habían apuntado (Malemud, 2010; Martel-Pelletier et al 2008). Es posible que la escasa modulación en la expresión génica de TNF- α esté relacionada con la ausencia de alteraciones detectadas en el número, forma o disposición de los condrocitos en el cartílago articular, eventos clásicos de un estadio más avanzado de la patología articular.

En relación al aumento de los niveles de IL-1 β observados en las articulaciones inyectadas con el inhibidor mitocondrial, recientemente se ha asociado a la mitocondria, y concretamente a un deterioro en su función, con la activación del inflamasoma NLRP3 (Zhang al., 2010a; Shimada et al., 2012), un complejo encargado de la maduración de las citoquinas IL-1 β e IL-18. Diferentes estudios han observado la participación de este complejo inflamatorio en respuestas patológicas en la articulación. Así, por ejemplo, cristales de hidroxipatita inducen en un modelo de sinovitis en ratones un aumento del influjo de neutrófilos a través de la activación del inflamasoma NLRP3 (Jin et al., 2011). Además, en ratones con mutaciones en este complejo con una activación constitutiva del mismo, se observan anormalidades en el desarrollo esquelético, pérdida en el número de condrocitos y la aparición de un infiltrado granulocítico (polimorfonuclear) en sus articulaciones y áreas circundantes (Bonar et al., 2012). Es posible activación que la activación inflamasoma esté implicada en las respuestas patológicas observadas en nuestro modelo de daño mitocondrial.

Con respecto al tejido sinovial, se observó mediante inmunohistoquímica como la inyección intraarticular del inhibidor mitocondrial incrementó también la expresión de IL-8 en este tejido. Como se comentó con anterioridad, esta quimioquina se caracteriza por su capacidad de atraer neutrófilos, por lo que un aumento en la secreción de IL-8/CINC-1 podría explicar el incremento del número de neutrófilos observado en estas articulaciones. De tal forma, la producción de IL-8/CINC-1 inducida por la inyección intraarticular de oligomicina en el cartílago y tejido sinovial podría participar en el perfil celular del infiltrado detectado en la articulación.

En la bibliografía previa son muchos los trabajos en los que asocia la producción de ROS, y el subsiguiente daño oxidativo y activación de vías de señalización sensibles al estado REDOX, con las respuestas inflamatorias articulares. Así, Kawai et al. (2000) señaló que los ROS mediaban en el desarrollo de un modelo de artritis inducida en ratas. Por otra parte, marcadores de daño oxidativo se asocian con progresión de la enfermedad y marcadores angiogénicos en la artritis inflamatoria (Biniecka et al., 2010). En el trabajo actual, hemos observado como el tejido sinovial de las articulaciones inyectadas con oligomicina presenta una mayor producción de ROS. Este resultado se correlaciona con los obtenidos *in vitro* en este estudio y en trabajos previos, que demuestran en condrocitos y sinoviocitos como oligomicina

incrementa los niveles de ROS mediando en la inducción de IL-8, COX-2, y su producto enzimático la PGE₂ (Cillero-Pastor et al., 2008; Valcárcel-Ares et al., 2013). Estos hallazgos en su conjunto, pueden sugerir que el estrés oxidativo generado por oligomicina en la articulación podría participar en la respuesta inflamatoria articular descrita anteriormente. En relación con esta hipótesis, Mukhopadhyay et al. (2012) observó que la generación de ROS mitocondriales en los primeros estadios de un modelo animal de I/R hepática desencadenaba la cascada inflamatoria y el daño tisular asociados a este proceso.

En resumen, en este apartado de la tesis se demostró por primera vez como la inducción de un fallo mitocondrial en una articulación sinovial desencadena una respuesta patológica en el cartílago y membrana sinovial; siendo este último el tejido principalmente afectado, al menos al tiempo evaluado en este modelo de daño mitocondrial agudo. Dentro de los procesos patológicos que se desencadenaron, destacaron la hiperplasia y el aumento de la celularidad, tanto del número de sinoviocitos como de un notable infiltrado de células inflamatorias, especialmente leucocitos polimorfonucleares. La infiltración de estas células en el tejido es un evento clave en el inicio de las respuestas inflamatorias (Baggiolini et al., 1989; Bonnet et al., 2005), y un proceso normalmente modulado por citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β (Lotz et al., 1992), cuyos niveles se encontraron incrementados en el cartílago. Esta modulación se basa en la capacidad de la citoquina de inducir en sinoviocitos y condrocitos, en una primera instancia, y posteriormente en los propios leucocitos quimioatraídos, la liberación de quimioquinas como IL-8/CINC-1 en el cartílago, y en el líquido y tejido sinovial (Kapoor et al., 2011). Este hecho, junto al propio efecto de la disfunción mitocondrial descrito anteriormente, podría explicar el aumento en la expresión de IL-8/CINC-1 detectado en el cartílago y tejido sinovial en este trabajo. En resumen, la alteración de la función mitocondrial en los condrocitos y sinoviocitos articulares podría participar activamente en el establecimiento y desarrollo de procesos patológicos articulares.

ARCHIMEDES erster erfinder scharpffsinniger vergleichung/
Wag vnd Gewicht / durch außfluß des Wassers.



VI. CONCLUSIONES

Imagen obtenida de <http://adictamente.blogspot.com.es/2012/04/como-se-inventan-los-inventos.html>

1. La disfunción en la actividad de la CRM, en concreto de los complejos III y V, aumenta la expresión génica y proteica de IL-8, generando una respuesta inflamatoria en condrocitos humanos normales en cultivo, así como en explantes de cartílago.
2. La disfunción mitocondrial aumenta la sensibilidad del condrocito a citoquinas en condrocitos humanos normales en cultivo.
 - a. La disfunción mitocondrial amplifica la expresión génica y proteica de IL-8 inducida por IL-1 β en el condrocito, así como su capacidad quimiotáctica.
 - b. La disfunción mitocondrial potencia la acción inflamatoria de IL-1 β sobre el condrocito, incrementando la expresión génica y proteica de COX-2 y de su producto enzimático la PGE₂.
 - c. La disfunción mitocondrial es capaz de incrementar la respuesta inflamatoria inducida por la citoquina TNF- α en el condrocito, al potenciar la expresión génica y proteica de IL-8, y la síntesis de PGE₂.
3. El silenciamiento con siARN de la proteína OSCP del complejo V de la CRM en una línea celular de condrocitos humanos aumenta la sensibilidad a IL-1 β
 - a. La línea celular de condrocitos humanos T/C-28a2 responde de forma similar que el cultivo primario de condrocitos humanos a la disfunción de la CRM.
 - b. El silenciamiento de OSCP en la línea celular amplifica la síntesis de IL-8 inducida por IL-1 β .
4. ROS, NF- κ B y la activación de caspasas participan activamente en la amplificación de la respuesta inflamatoria a citoquinas inducida por la disfunción mitocondrial en condrocitos humanos en cultivo.
5. El resveratrol disminuye la respuesta inflamatoria inducida por la sinergia entre la disfunción mitocondrial y la IL-1 β , al reducir la síntesis de PGE₂ e IL-8; así como también la capacidad quimiotáctica sobre PMN en condrocitos humanos en cultivo.
6. La inyección de oligomicina en la cavidad articular de las rodillas de rata induce una respuesta inflamatoria en el cartílago y tejido sinovial.
 - a. La inyección de oligomicina en la cavidad articular de la rodilla de los animales induce un incremento en el diámetro articular que se correlaciona con una respuesta inflamatoria visible a nivel macroscópico.
 - b. Oligomicina induce una respuesta patológica en la articulación, si bien no detectable microscópicamente a nivel del cartílago, al menos al tiempo

evaluado, si claramente visible en la sinovial. Esta respuesta se caracteriza por una hiperplasia e hipertrofia del tejido, además de un incremento en el infiltrado inflamatorio de células polimorfonucleares.

- c. La inyección de oligomicina induce en la articulación la expresión de mediadores inflamatorios, tanto en el cartílago como en la sinovial.
- d. La inyección intraarticular de oligomicina desencadena un aumento del estrés oxidativo en la membrana sinovial.

En resumen, los resultados obtenidos en la presente tesis indican que el deterioro de la función mitocondrial en el condrocito participa activamente en el perfil inflamatorio observado en el condrocito artrósico, al amplificar *in vitro* la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas. Este efecto es mediado, al menos en parte, por un aumento del estrés oxidativo y de la activación del factor nuclear NF- κ B, así como de la activación de las caspasas. El resveratrol, un polifenol natural, es capaz de controlar la expresión y síntesis de mediadores inflamatorios en este modelo, afianzándose como una posible estrategia en la modulación de la respuesta inflamatoria. Por último, hemos demostrado por primera vez *in vivo* en un modelo articular murino que la disfunción mitocondrial de los tejidos articulares puede desencadenar el daño articular, al incrementar el estado inflamatorio tanto en el cartílago como en la sinovial.



VII. BIBLIOGRAFÍA

Imagen obtenida de <http://www.envhist.com/?tag=literature>

ARTÍCULOS

- Resveratrol. Monograph. *Altern Med Rev*. 2010; 15(2): 152-8.
- Abramson SB. Inflammation in osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl*. 2004; 70: 70-6.
- Abramson SB, Attur M, Yazici Y. Prospects for disease modification in osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006; 2: 304-12.
- Abramson SB. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008; 10 Suppl 2: S2.
- Abulencia JP, Gaspard R, Healy ZR, Gaarde WA, Quackenbush J, Konstantopoulos K. Shear-induced cyclooxygenase-2 via a JNK2/c-Jun-dependent pathway regulates prostaglandin receptor expression in chondrocytic cells. *J Biol Chem*. 2003; 278: 28388-94.
- Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med*. 1992; 175(2): 323-9.
- Aguilera-Aguirre L, Bacsí A, Saavedra-Molina A, Kurosky A, Sur S, Boldogh I. Mitochondrial dysfunction increases allergic airway inflammation. *J Immunol*. 2009; 183: 5379-87.
- Aigner T, Kim HA. Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration. *Arthritis Rheum*. 2002; 46(8): 1986-96.
- Aigner T, Cook JL, Gerwin N, Glasson SS, Lavery S, Little CB, et al. Histopathology atlas of animal model systems - overview of guiding principles. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010; 18 Suppl 3: S2-6.
- Alaaeddine N, DiBattista JA, Pelletier JP, Cloutier JM, Kiansa K, Dupuis M, et al. Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha. *J Rheumatol*. 1997; 24(10): 1985-94.
- Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 936486.
- Álvarez-Soria MA, Herrero-Beaumont G, Moreno-Rubio J, Calvo E, Santillana J, Egido J, et al. Long-term NSAID treatment directly decreases COX-2 and mPGES-1 production in the articular cartilage of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008; 16(12): 1484-93.
- Álvarez-Soria MA, Largo R, Sanchez-Pernaute O, Calvo E, Egido J, Herrero-Beaumont G. Prostaglandin E2 receptors EP1 and EP4 are up-regulated in rabbit chondrocytes by IL-1beta, but not by TNFalpha. *Rheumatol Int*. 2007; 27(10): 911-7.
- Amin AR. Regulation of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor converting enzyme in human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1999; 7: 392-4.
- Amin AR, Attur M, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ, Rediske J, et al. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage.

Influence of nitric oxide. *J Clin Invest.* 1997; 99(6): 1231-7.

- Appleton CT, McErlain DD, Pitelka V, Schwartz N, Bernier SM, Henry JL, et al. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9: R13.
- Attur MG, Patel IR, Patel RN, Abramson SB, Amin AR. Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8. *Proc Assoc Am Physicians.* 1998; 110(1):65-72.
- Attur MG, Dave M, Akamatsu M, Katoh M, Amin AR. Osteoarthritis or osteoarthritis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002; 10: 1-4.
- Attur M, Al-Mussawir HE, Patel J, Kitay A, Dave M, Palmer G, et al. Prostaglandin E2 exerts catabolic effects in osteoarthritis cartilage: evidence for signaling via the EP4 receptor. *J Immunol.* 2008; 181: 5082-8.
- Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest.* 1989;84(4):1045-9.
- Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett.* 1995; 372: 83-7.
- Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64(9): 1263-7.
- Benton HP, Tyler JA. Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin I. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 154(1): 421-8.
- Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthritis!). *Osteoarthritis Cartilage.* 2013; 21(1): 16-21.
- Bhattacharya I, Saxena R, Gupta V. Efficacy of vitamin E in knee osteoarthritis management of North Indian geriatric population. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2012; 4: 11-9.
- Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull.* 2008; 87: 77-95.
- Biniecka M, Fox E, Gao W, Ng CT, Veale DJ, Fearon U, et al. Hypoxia induces mitochondrial mutagenesis and dysfunction in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(8): 2172-82.
- Biniecka M, Kennedy A, Fearon U, Ng CT, Veale DJ, O'Sullivan JN. Oxidative damage in synovial tissue is associated with in vivo hypoxic status in the arthritic joint. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 1172-8.
- Blain EJ. Mechanical regulation of matrix metalloproteinases. *Front Biosci.* 2007; 12:507-27.
- Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric

oxide. *Am J Pathol.* 1995; 146(1): 75-85.

- Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011; 7: 161-9.
- Bonar SL, Brydges SD, Mueller JL, McGeough MD, Pena C, Chen D, et al. Constitutively activated NLRP3 inflammasome causes inflammation and abnormal skeletal development in mice. *PLoS One.* 2012; 7: e35979.
- Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford).* 2005; 44(1): 7-16.
- Borzi RM, Mazzetti I, Macor S, Silvestri T, Bassi A, Cattini L, et al. Flow cytometric analysis of intracellular chemokines in chondrocytes in vivo: constitutive expression and enhancement in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.* 1999; 455: 238-42.
- Borzi RM, Mazzetti I, Cattini L, Ugucioni M, Baggiolini M, Facchini A. Human chondrocytes express functional chemokine receptors and release matrix-degrading enzymes in response to C-X-C and C-C chemokines. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(8):1734-41.
- Borzi RM, Mazzetti I, Marcu KB, Facchini A. Chemokines in cartilage degradation. *Clin Orthop Relat Res.* 2004; 427 (Suppl): S53-61.
- Boyer PD. A research journey with ATP synthase. *J Biol Chem.* 2002; 277(42): 39045-61.
- Brand C, Snaddon J, Bailey M, Cicuttini F. Vitamin E is ineffective for symptomatic relief of knee osteoarthritis: a six month double blind, randomised, placebo controlled study. *Ann Rheum Dis.* 2001; 60(10): 946-9.
- Broom ND. Further insights into the structural principles governing the function of articular cartilage. *J Anat.* 1984; 139 (Pt 2): 275-94.
- Brown KD, Claudio E, Siebenlist U. The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10(4): 212.
- Bulua AC, Simon A, Maddipati R, Pelletier M, Park H, Kim KY, et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med.* 2011; 208: 519-33.
- Byun HS, Song JK, Kim YR, Piao L, Won M, Park KA, et al. Caspase-8 has an essential role in resveratrol-induced apoptosis of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford).* 2008; 47(3): 301-8.
- Camara AK, Bienengraeber M, Stowe DF. Mitochondrial approaches to protect against cardiac ischemia and reperfusion injury. *Front Physiol.* 2011; 2:13.
- Canter PH, Wider B, Ernst E. The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials. *Rheumatology (Oxford).* 2007; 46: 1223-33.

- Caramés B, López-Armada MJ, Cillero-Pastor B, Lires-Deán M, Vaamonde C, Galdo F, et al. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta on cell death in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008; 16: 715-22.
- Caramés B, Taniguchi N, Otsuki S, Blanco FJ, Lotz M. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2010; 62(3): 791-801.
- Caramés B, Hasegawa A, Taniguchi N, Miyaki S, Blanco FJ, Lotz M. Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012; 71: 575-81.
- Carp H. Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J Exp Med*. 1982; 155(1): 264-75.
- Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005; 48: 16-42.
- Cecil DL, Rose DM, Terkeltaub R, Liu-Bryan R. Role of interleukin-8 in PiT-1 expression and CXCR1-mediated inorganic phosphate uptake in chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2005; 52(1): 144-54.
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. *J Biol Chem*. 2000; 275: 25130-8.
- Chen A, Raule N, Chomyn A, Attardi G. Decreased reactive oxygen species production in cells with mitochondrial haplogroups associated with longevity. *PLoS One*. 2012; 7(10): e46473.
- Choi HM, Oh dH, Bang JS, Yang HI, Yoo MC, Kim KS. Differential effect of IL-1 β and TNF α on the production of IL-6, IL-8 and PGE2 in fibroblast-like synoviocytes and THP-1 macrophages. *Rheumatol Int*. 2010; 30(8): 1025-33.
- Chowanadisai W, Bauerly KA, Tchapanian E, Wong A, Cortopassi GA, Rucker RB. Pyrroloquinoline quinone stimulates mitochondrial biogenesis through cAMP response element-binding protein phosphorylation and increased PGC-1alpha expression. *J Biol Chem*. 2010; 285: 142-52.
- Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, et al. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev*. 2009; 8: 18-30.
- Cicha I, Regler M, Urschel K, Goppelt-Struebe M, Daniel WG, Garlischs CD. Resveratrol inhibits monocytic cell chemotaxis to MCP-1 and prevents spontaneous endothelial cell migration through Rho kinase-dependent mechanism. *J Atheroscler Thromb*. 2011; 18:

1031-42.

- Cillero-Pastor B, Caramés B, Lires-Deán M, Vaamonde-García C, Blanco FJ, Lopez-Armada MJ. Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(8): 2409-19.
- Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, Caramés B, López-Armada MJ, Blanco FJ. Proteomic analysis by two-dimensional electrophoresis to identify the normal human chondrocyte proteome stimulated by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(3): 802-14.
- Cillero-Pastor B, Martín MA, Arenas J, López-Armada MJ, Blanco FJ. Effect of nitric oxide on mitochondrial activity of human synovial cells. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011; 12: 42.
- Cillero-Pastor B, Mateos J, Fernández-López C, Oreiro N, Ruiz-Romero C, Blanco FJ. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2, a newly identified mitochondrial protein modulating nitric oxide synthesis in normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(1): 204-12.
- Cillero-Pastor B, Rego-Pérez I, Oreiro N, Fernández-López C, Blanco FJ. Mitochondrial respiratory chain dysfunction modulates metalloproteases -1, -3 and -13 in human normal chondrocytes in culture. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013; 14: 235.
- Close DR. Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2001; 60 Suppl 3: iii62-7.
- Colin D, Limagne E, Jeanningros S, Jacquiel A, Lizard G, Athias A, et al. Endocytosis of resveratrol via lipid rafts and activation of downstream signaling pathways in cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011; 4: 1095-106.
- Conde J, Gomez R, Bianco G, Scotece M, Lear P, Dieguez C, et al. Expanding the adipokine network in cartilage: identification and regulation of novel factors in human and murine chondrocytes. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70: 551-9.
- Cook-Mills JM, McCary CA. Isoforms of vitamin E differentially regulate inflammation. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2010; 10: 348-66.
- Cope AP, Aderka D, Doherty M, Engelmann H, Gibbons D, Jones AC, et al. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 1992; 35(10): 1160-9.
- Corduneanu O, Janeiro P, Oliveira-Brett AM. On the Electrochemical Oxidation of Resveratrol. *Electroanalysis.* 2006; 18(8): 757-62.
- Csaki C, Keshishzadeh N, Fischer K, Shakibaei M. Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes in vitro. *Biochem Pharmacol.* 2008; 75: 677-87.
- Csaki C, Mobasheri A, Shakibaei M. Synergistic chondroprotective effects of curcumin

and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1 β -induced NF- κ B-mediated inflammation and apoptosis. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11: R165.

- Csiszar A, Wang M, Lakatta EG, Ungvari Z. Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF- κ B. *J Appl Physiol*. 2008; 105: 1333-41.
- Csiszar A, Labinskyy N, Pinto JT, Ballabh P, Zhang H, Losonczy G, et al. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297(1): H13-20.
- Cullen JP, Morrow D, Jin Y, von Offenbergen Sweeney N, Sitzmann JV, Cahill PA, et al. Resveratrol inhibits expression and binding activity of the monocyte chemotactic protein-1 receptor, CCR2, on THP-1 monocytes. *Atherosclerosis*. 2007; 195: e125-33.
- Cunningham CC, George DT. The relationship between the bovine heart mitochondrial adenosine triphosphatase, lipophilic compounds, and oligomycin. *J Biol Chem*. 1975; 250(6): 2036-44.
- Da Sylva TR, Connor A, Mburu Y, Keystone E, Wu GE. Somatic mutations in the mitochondria of rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(4):R844-51.
- Dai DF, Rabinovitch PS, Ungvari Z. Mitochondria and cardiovascular aging. *Circ Res*. 2012; 110(8): 1109-24.
- Dave M, Attur M, Palmer G, Al-Mussawir HE, Kennish L, Patel J, et al. The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis via effects on mitochondrial polarization and ATP production. *Arthritis Rheum*. 2008; 58(9): 2786-97.
- Davies CM, Guilak F, Weinberg JB, Fermor B. Reactive nitrogen and oxygen species in interleukin-1-mediated DNA damage associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008; 16: 624-30.
- De Benedictis G, Rose G, Carrieri G, De Luca M, Falcone E, Passarino G, et al. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J*. 1999; 13(12): 1532-6.
- de Lange-Brokaar BJ, Ioan-Facsinay A, van Osch GJ, Zuurmond AM, Schoones J, Toes RE, et al. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012; 20(12): 1484-99.
- Del Carlo M, Schwartz D, Erickson EA, Loeser RF. Endogenous production of reactive oxygen species is required for stimulation of human articular chondrocyte matrix metalloproteinase production by fibronectin fragments. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42: 1350-8.
- Delmas D, Aires V, Limagne E, Dutartre P, Mazue F, Ghiringhelli F, et al. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*. 2011; 1215:4 8-59.
- Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS, Leung RH, Ito K, et al. Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *Am J*

Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004; 287: L774-83.

- Duchen MR. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes*. 2004; 53 Suppl 1: S96-102.
- Ehrlich GE. Osteoarthritis beginning with inflammation. Definitions and correlations. *JAMA*. 1975; 232(2): 157-9.
- Elmali N, Esenkaya I, Harma A, Ertem K, Turkoz Y, Mizrak B. Effect of resveratrol in experimental osteoarthritis in rabbits. *Inflamm Res*. 2005; 54(4): 158-62.
- Elmali N, Baysal O, Harma A, Esenkaya I, Mizrak B. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation*. 2007;30(1-2):1-6.
- Emerling BM, Platanias LC, Black E, Nebreda AR, Davis RJ, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling. *Mol Cell Biol*. 2005; 25: 4853-62.
- Escames G, López LC, García JA, García-Corzo L, Ortiz F, Acuna-Castroviejo D. Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. *Hum Genet*. 2012; 131(2): 161-73
- Facchini A, Borzi RM, Marcu KB, Stefanelli C, Olivotto E, Goldring MB, et al. Polyamine depletion inhibits NF-kappaB binding to DNA and interleukin-8 production in human chondrocytes stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *J Cell Physiol*. 2005; 204(3): 956-63.
- Falchuk KH, Goetzl EJ, Kulka JP. Respiratory gases of synovial fluids. An approach to synovial tissue circulatory-metabolic imbalance in rheumatoid arthritis. *Am J Med*. 1970; 49(2): 223-31.
- Fan Z, Bau B, Yang H, Soeder S, Aigner T. Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1beta. *Arthritis Rheum*. 2005; 52(1): 136-43.
- Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*. 2002; 39(1-2): 237-46.
- Finger F, Schorle C, Zien A, Gebhard P, Goldring MB, Aigner T. Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/I2. *Arthritis Rheum*. 2003; 48(12): 3395-403.
- Furuzawa-Carballeda J, Macip-Rodríguez PM, Cabral AR. Osteoarthritis and rheumatoid arthritis pannus have similar qualitative metabolic characteristics and pro-inflammatory cytokine response. *Clin Exp Rheumatol*. 2008; 26(4): 554-60.
- Gavriilidis C, Miwa S, von Zglinicki T, Taylor RW, Young DA. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis is associated with down-regulation of superoxide dismutase 2. *Arthritis Rheum*. 2013; 65(2): 378-87.
- Geng Y, Blanco FJ, Cornelissen M, Lotz M. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. *J Immunol*. 1995; 155(2): 796-801.

- Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, Carlson CS. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010; 18 (Suppl 3): S24-34.
- Gibson JS, Milner PI, White R, Fairfax TP, Wilkins RJ. Oxygen and reactive oxygen species in articular cartilage: modulators of ionic homeostasis. *Pflügers Arch*. 2008; 455(4): 563-73.
- Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature*. 2005; 434: 644-8.
- Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, Kimura T, Krane SM. Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J Clin Invest*. 1988; 82(6): 2026-37.
- Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, et al. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest*. 1994; 94(6): 2307-16.
- Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2000; 43(9): 1916-26.
- Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011; 23(5): 471-8.
- Goto M. Inflammaging (inflammation + aging): A driving force for human aging based on an evolutionarily antagonistic pleiotropy theory? *Biosci Trends*. 2008; 2(6): 218-30.
- Grishko VI, Ho R, Wilson GL, Pearsall AW. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009; 17: 107-13.
- Guerne PA, Carson DA, Lotz M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. *J Immunol*. 1990; 144(2): 499-505.
- Guidarelli A, Cerioni L, Cantoni O. Inhibition of complex III promotes loss of Ca²⁺ dependence for mitochondrial superoxide formation and permeability transition evoked by peroxynitrite. *J Cell Sci*. 2007; 120(Pt 11): 1908-14.
- Harty LC, Biniecka M, O'Sullivan J, Fox E, Mulhall K, Veale DJ, et al. Mitochondrial mutagenesis correlates with the local inflammatory environment in arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012; 71: 582-8.
- Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008; 132: 344-62.
- Hedbom E, Hauselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 2002; 59(1): 45-53.
- Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis

and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003; 11: 747-55.

- Henrotin YE, Blanco FJ, Aigner T, Kurz B. The significance of oxidative stress in articular cartilage ageing and degradation. *Curr Rheumatol rev*. 2007; 261-74.
- Higuchi M, Aggarwal BB. Inhibition of ligand binding and antiproliferative effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin by soluble forms of recombinant P60 and P80 receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 182: 638-43.
- Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol*. 2002; 72(5): 847-55.
- Horton WE, Jr., Bennion P, Yang L. Cellular, molecular, and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006; 6(4): 379-81.
- Huerta C, Castro MG, Coto E, Blázquez M, Ribacoba R, Guisasola LM, et al. Mitochondrial DNA polymorphisms and risk of Parkinson's disease in Spanish population. *J Neurol Sci*. 2005; 236(1-2): 49-54.
- Hyllested JL, Veje K, Ostergaard K. Histochemical studies of the extracellular matrix of human articular cartilage--a review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002; 10: 333-43.
- Idogawa H, Imamura A, Matsuo K, Yoshitake K, Umemura T, Ohashi M. A monoarthritis model in rabbits induced by repeated intra-articular injections of lipopolysaccharide. *Int J Exp Pathol*. 1998; 79(2): 93-104.
- Imoto S, Watanabe S, Takahashi T, Shimizu A, Yamamoto H. The influence of Celecoxib on matrix synthesis by chondrocytes under mechanical stress in vitro. *Int J Mol Med*. 2005; 16(6): 1083-8.
- Inoue K, Nakada K, Ogura A, Isobe K, Goto Y, Nonaka I, et al. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet*. 2000; 26(2): 176-81.
- Islam S, Kermode T, Sultana D, Moskowitz RW, Mukhtar H, Malemud CJ, et al. Expression profile of protein tyrosine kinase genes in human osteoarthritis chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001; 9: 684-93.
- Jasin HE, Taurog JD. Mechanisms of disruption of the articular cartilage surface in inflammation. Neutrophil elastase increases availability of collagen type II epitopes for binding with antibody on the surface of articular cartilage. *J Clin Invest*. 1991; 87(5): 1531-6.
- Jeffrey DR, Watt I. Imaging hyaline cartilage. *Br J Radiol*. 2003; 76(911): 777-87.
- Jin C, Frayssinet P, Pelker R, Cwirka D, Hu B, Vignery A, et al. NLRP3 inflammasome plays a critical role in the pathogenesis of hydroxyapatite-associated arthropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 14867-72.
- Johnson K, Jung A, Murphy A, Andreyev A, Dykens J, Terkeltaub R. Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization. *Arthritis Rheum*. 2000; 43(7): 1560-70.

- Johnson K, Svensson CI, Etten DV, Ghosh SS, Murphy AN, Powell HC, et al. Mediation of spontaneous knee osteoarthritis by progressive chondrocyte ATP depletion in Hartley guinea pigs. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(4): 1216-25.
- Jubb RW, Eggert FM. Staining of demineralized cartilage. II. Quantitation of articular cartilage proteoglycan after fixation and rapid demineralization. *Histochemistry.* 1981; 73(3): 391-6.
- Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H. Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal.* 2005; 7(3-4): 395-403.
- Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011; 7(1): 33-42.
- Karan A, Karan MA, Vural P, Erten N, Tascioglu C, Aksoy C, et al. Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol.* 2003; 22(6): 397-9.
- Kawai Y, Kubota E, Okabe E. Reactive oxygen species participation in experimentally induced arthritis of the temporomandibular joint in rats. *J Dent Res.* 2000; 79(7): 1489-95.
- Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets.* 2007; 8(2): 333-45.
- Kim J, Xu M, Xo R, Mates A, Wilson GL, Pearsall AWt, et al. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010; 18: 424-32.
- Kim SB, Berdanier CD. Oligomycin sensitivity of mitochondrial F(1)F(0)-ATPase in diabetes-prone BHE/Cdb rats. *Am J Physiol.* 1999; 277(4 Pt 1): E702-7.
- Kiraly K, Lapvetelainen T, Arokoski J, Torronen K, Modis L, Kiviranta I, et al. Application of selected cationic dyes for the semiquantitative estimation of glycosaminoglycans in histological sections of articular cartilage by microspectrophotometry. *Histochem J.* 1996; 28(8): 577-90.
- Kramar R, Hohenegger M, Srouf AN, Khanakah G. Oligomycin toxicity in intact rats. *Agents Actions.* 1984; 15(5-6): 660-3.
- Krasnokutsky S, Samuels J, Abramson SB. Osteoarthritis in 2007. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007 ;65(3): 222-8.
- Kriete A, Mayo KL. Atypical pathways of NF-kappaB activation and aging. *Exp Gerontol.* 2009; 44(4): 250-5.
- Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, et al. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol.* 2011; 32(4): 157-64.
- Kurz B, Jost B, Schunke M. Dietary vitamins and selenium diminish the development

of mechanically induced osteoarthritis and increase the expression of antioxidative enzymes in the knee joint of STR/1N mice. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002; 10: 119-26.

- Kwong JQ, Beal MF, Manfredi G. The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. *J Neurochem*. 2006; 97: 1659-75.
- Lacza Z, Pankotai E, Busija DW. Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies. *Front Biosci*. 2009; 14: 4436-43.
- Lane Smith R, Trindade MC, Ikenoue T, Mohtai M, Das P, Carter DR, et al. Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism. *Biorheology*. 2000; 37(1-2): 95-107.
- Largo R, Díez-Ortego I, Sanchez-Pernaute O, López-Armada MJ, Álvarez-Soria MA, Egidio J, et al. EP2/EP4 signalling inhibits monocyte chemoattractant protein-1 production induced by interleukin 1beta in synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis*. 2004; 63(10): 1197-204.
- Lauder SN, Carty SM, Carpenter CE, Hill RJ, Talamas F, Bondeson J, et al. Interleukin-1beta induced activation of nuclear factor-kappaB can be inhibited by novel pharmacological agents in osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2007; 46(5): 752-8.
- Lee YS, Bak EJ, Kim M, Park W, Seo JT, Yoo YJ. Induction of IL-8 in periodontal ligament cells by H₂O₂. *J Microbiol*. 2008; 46(5): 579-84.
- Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G. Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1990; 1052: 366-78.
- Li NG, Shi ZH, Tang YP, Wang ZJ, Song SL, Qian LH, et al. New hope for the treatment of osteoarthritis through selective inhibition of MMP-13. *Curr Med Chem*. 2011; 18: 977-1001.
- Li X, Afif H, Cheng S, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, et al. Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J Rheumatol*. 2005; 32(5): 887-95.
- Li X, Ellman M, Muddasani P, Wang JH, Cs-Szabo G, van Wijnen AJ, et al. Prostaglandin E2 and its cognate EP receptors control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2009; 60(2): 513-23.
- Li YP, Atkins CM, Sweatt JD, Reid MB. Mitochondria mediate tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB signaling in skeletal muscle myotubes. *Antioxid Redox Signal*. 1999; 1(1): 97-104.
- Lin Z, Willers C, Xu J, Zheng MH. The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Eng*. 2006; 12(7): 1971-84.
- Liu CY, Lee CF, Wei YH. Role of reactive oxygen species-elicited apoptosis in the pathophysiology of mitochondrial and neurodegenerative diseases associated with

mitochondrial DNA mutations. *J Formos Med Assoc.* 2009; 182: 599-611.

- Lo YY, Conquer JA, Grinstein S, Cruz TF. Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species. *J Cell Biochem.* 1998; 69: 19-29.
- Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009; 19: 971-9.
- Loeser RF. Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med.* 2010; 26: 371-86.
- López-Armada MJ, Sanchez-Pernaute O, Largo R, Diez-Ortego I, Palacios I, Egido J, et al. Modulation of cell recruitment by anti-inflammatory agents in antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61(11):1027-30.
- López-Armada MJ, Caramés B, Lires-Deán M, Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, Galdo F, et al. Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006a; 14: 660-9.
- López-Armada MJ, Caramés B, Martín MA, Cillero-Pastor B, Lires-Deán M, Fuentes-Boquete I, et al. Mitochondrial activity is modulated by TNFalpha and IL-1beta in normal human chondrocyte cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006b; 14: 1011-22.
- López-Armada MJ, Vaamonde-García C, Caramés B, Lires-Deán M, Cillero-Pastor B, Blanco García FJ. [Evidence of inflammatory mechanisms in osteoarthritis]. *Reumatol Clin.* 2007; 3 (Suppl 3): S23-7.
- López-Armada MJ, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-García C, Valcárcel-Ares MN. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. *Mitochondrion.* 2013; 13(2): 106-18.
- Lotz M, Terkeltaub R, Villiger PM. Cartilage and joint inflammation. Regulation of IL-8 expression by human articular chondrocytes. *J Immunol.* 1992; 148(2): 466-73.
- Lotz MK, Otsuki S, Grogan SP, Sah R, Terkeltaub R, D'Lima D. Cartilage cell clusters. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(8): 2206-18.
- Lund-Olesen K. Oxygen tension in synovial fluids. *Arthritis Rheum.* 1970; 13(6): 769-76.
- Mainardi CL, Hasty KA, Hibbs MS. Collagen degradation by inflammatory phagocytes. *J Rheumatol.* 1987; 14 Spec No: 59-60.
- Malemud CJ. Anticytokine therapy for osteoarthritis: evidence to date. *Drugs Aging.* 2010; 27: 95-115.
- Malfait AM, Verbruggen G, Veys EM, Lambert J, De Ridder L, Cornelissen M. Comparative and combined effects of interleukin 6, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha on proteoglycan metabolism of human articular chondrocytes cultured in agarose. *J Rheumatol.* 1994; 21(2): 314-20.

- Maneiro E, Martín MA, de Andres MC, López-Armada MJ, Fernández-Sueiro JL, del Hoyo P, et al. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2003; 48(3): 700-8.
- Maneiro E, López-Armada MJ, de Andres MC, Caramés B, Martín MA, Bonilla A, et al. Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64: 388-95.
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am.* 1971; 53(3): 523-37.
- Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol.* 2000; 164(12): 6509-19.
- Mannella CA. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1763(5-6): 542-8.
- Marcu KB, Otero M, Olivotto E, Borzi RM, Goldring MB. NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets.* 2010; 11: 599-613.
- Marcus RE. The effect of low oxygen concentration on growth, glycolysis, and sulfate incorporation by articular chondrocytes in monolayer culture. *Arthritis Rheum.* 1973; 16(5): 646-56.
- Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008; 22: 351-84.
- Martin JA, Buckwalter JA. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biogerontology.* 2002; 3: 257-64.
- Mathy-Hartert M, Jacquemond-Collet I, Priem F, Sanchez C, Lambert C, Henrotin Y. Curcumin inhibits pro-inflammatory mediators and metalloproteinase-3 production by chondrocytes. *Inflamm Res.* 2009; 58(12): 899-908.
- Mazzetti I, Magagnoli G, Paoletti S, Ugucioni M, Olivotto E, Vitellozzi R, et al. A role for chemokines in the induction of chondrocyte phenotype modulation. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(1): 112-22.
- Mendes AF, Caramona MM, Carvalho AP, Lopes MC. Differential roles of hydrogen peroxide and superoxide in mediating IL-1-induced NF-kappa B activation and iNOS expression in bovine articular chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2003a; 88(4): 783-93.
- Mendes AF, Caramona MM, Carvalho AP, Lopes MC. Hydrogen peroxide mediates interleukin-1beta-induced AP-1 activation in articular chondrocytes: implications for the regulation of iNOS expression. *Cell Biol Toxicol.* 2003b; 19(4): 203-14.
- Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1

induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(4): 801-11.

- Merz D, Liu R, Johnson K, Terkeltaub R. IL-8/CXCL8 and growth-related oncogene alpha/CXCL1 induce chondrocyte hypertrophic differentiation. *J Immunol.* 2003; 171(8): 4406-15.
- Milner PI, Wilkins RJ, Gibson JS. The role of mitochondrial reactive oxygen species in pH regulation in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007; 15: 735-42.
- Min BH, Kim HJ, Lim H, Park CS, Park SR. Effects of ageing and arthritic disease on nitric oxide production by human articular chondrocytes. *Exp Mol Med.* 2001; 33(4): 299-302.
- Mobasheri A, Henrotin Y, Biesalski HK, Shakibaei M. Scientific evidence and rationale for the development of curcumin and resveratrol as nutraceuticals for joint health. *Int J Mol Sci.* 2012; 13: 4202-32.
- Mobasheri A. The future of osteoarthritis therapeutics: targeted pharmacological therapy. *Curr Rheumatol Rep.* 2013; 15(10): 364.
- Moreno-Rubio J, Herrero-Beaumont G, Tardio L, Álvarez-Soria MA, Largo R. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and prostaglandin E(2) modulate the synthesis of osteoprotegerin and RANKL in the cartilage of patients with severe knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(2): 478-88.
- Mort JS, Billington CJ. Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation. *Arthritis Res.* 2001; 3(6): 337-41.
- Mueller MB, Tuan RS. Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. *PM R.* 2011; 3(6 Suppl 1): S3-11.
- Mukhopadhyay P, Horvath B, Zsengeller Z, Batkai S, Cao Z, Kechrid M, et al. Mitochondrial reactive oxygen species generation triggers inflammatory response and tissue injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: therapeutic potential of mitochondrially targeted antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53: 1123-38.
- Murphy G, Lee MH. What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage? *Ann Rheum Dis.* 2005; 64 (Suppl 4): iv44-7.
- Murrell GA, Jang D, Williams RJ. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 206: 15-21.
- Nagase H, Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther.* 2003; 5(2): 94-103.
- Nah SS, Choi IY, Lee CK, Oh JS, Kim YG, Moon HB, et al. Effects of advanced glycation end products on the expression of COX-2, PGE2 and NO in human osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatology (Oxford).* 2008; 47: 425-31.
- Nakagawa S, Arai Y, Mazda O, Kishida T, Takahashi KA, Sakao K, et al. N-

acetylcysteine prevents nitric oxide-induced chondrocyte apoptosis and cartilage degeneration in an experimental model of osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2010; 28(2): 156-63.

- Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 768-84.
- Oh M, Fukuda K, Asada S, Yasuda Y, Tanaka S. Concurrent generation of nitric oxide and superoxide inhibits proteoglycan synthesis in bovine articular chondrocytes: involvement of peroxynitrite. *J Rheumatol.* 1998; 25(11): 2169-74.
- Ohashi K, Naruto M, Nakaki T, Sano E. Identification of interleukin-8 converting enzyme as cathepsin L. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1649(1): 30-9.
- Ospelt C, Gay S. Somatic mutations in mitochondria: the chicken or the egg? *Arthritis Res Ther.* 2005; 7: 179-80.
- Otterness IG, Bliven ML, Milici AJ, Poole AR. Comparison of mobility changes with histological and biochemical changes during lipopolysaccharide-induced arthritis in the hamster. *Am J Pathol.* 1994; 144(5): 1098-108.
- Palao G, Santiago B, Galindo MA, Rullas JN, Alcamí J, Ramirez JC, et al. Fas activation of a proinflammatory program in rheumatoid synoviocytes and its regulation by FLIP and caspase 8 signaling. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(5): 1473-81.
- Palmer RM, Hickery MS, Charles IG, Moncada S, Bayliss MT. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 193: 398-405.
- Paquet J, Goebel JC, Delaunay C, Pinzano A, Grossin L, Cournil-Henrionnet C, et al. Cytokines profiling by multiplex analysis in experimental arthritis: which pathophysiological relevance for articular versus systemic mediators? *Arthritis Res Ther.* 2012; 14: R60.
- Park CB, Larsson NG. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol.* 2011; 193: 809-18.
- Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell.* 2012; 148(3): 421-33.
- Pascual Garrido C, Hakimiyan AA, Rappoport L, Oegema TR, Wimmer MA, Chubinskaya S. Anti-apoptotic treatments prevent cartilage degradation after acute trauma to human ankle cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009; 17(9): 1244-51.
- Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Tardif G, Martel-Pelletier J. The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage.* 1996; 4(1): 77-84.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(6): 1237-47.
- Perlman H, Georganas C, Pagliari LJ, Koch AE, Haines K, Pope RM. Bcl-2 expression

in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability. *J Immunol.* 2000; 164(10): 5227-35.

- Poole R, Blake S, Buschmann M, Goldring S, Lavery S, Lockwood S, et al. Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010; 18 Suppl 3: S10-6.
- Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006; 14: 13-29.
- Pulai JI, Chen H, Im HJ, Kumar S, Hanning C, Hegde PS, et al. NF-kappa B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. *J Immunol.* 2005; 174: 5781-8.
- Pulsatelli L, Dolzani P, Piacentini A, Silvestri T, Ruggeri R, Gualtieri G, et al. Chemokine production by human chondrocytes. *J Rheumatol.* 1999; 26(9): 1992-2001.
- Quinn JH, Bazan NG. Identification of prostaglandin E2 and leukotriene B4 in the synovial fluid of painful, dysfunctional temporomandibular joints. *J Oral Maxillofac Surg.* 1990; 48: 968-71.
- Ramage L, Nuki G, Salter DM. Signalling cascades in mechanotransduction: cell-matrix interactions and mechanical loading. *Scand J Med Sci Sports.* 2009; 19: 457-69.
- Ramsay RG, Ciznadija D, Vanevski M, Mantamadiotis T. Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase expression: three pillars of control. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2003; 16: 59-67.
- Rasheed Z, Akhtar N, Haqqi TM. Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 by receptor for advanced glycation end product-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB in human osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatology (Oxford).* 2011; 50: 838-51.
- Rediske JJ, Koehne CF, Zhang B, Lotz M. The inducible production of nitric oxide by articular cell types. *Osteoarthritis Cartilage.* 1994; 2(3): 199-206.
- Rego I, Fernández-Moreno M, Fernández-López C, Gómez-Reino JJ, González A, Arenas J, et al. Role of European mitochondrial DNA haplogroups in the prevalence of hip osteoarthritis in Galicia, Northern Spain. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(1): 210-3.
- Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Fernández-López C, Arenas J, Blanco FJ. Mitochondrial DNA haplogroups: role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(8): 2387-96.
- Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Deberg M, Pertega S, Fernández-López C, Oreiro N, et al. Mitochondrial DNA haplogroups modulate the serum levels of biomarkers in patients with osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 910-7.
- Rengel Y, Ospelt C, Gay S. Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in

joint destruction. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9: 221.

- Roach HI. The complex pathology of osteoarthritis: even mitochondria are involved. *Arthritis Rheum*. 2008; 58(8): 2217-8.
- Román-Blas JA, Stokes DG, Jimenez SA. Modulation of TGF-beta signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007; 15: 1367-77.
- Ruiz-Romero C, Carreira V, Rego I, Remeseiro S, López-Armada MJ, Blanco FJ. Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. *Proteomics*. 2008; 8(3): 495-507.
- Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, Carreira V, Martinez-Gomariz M, Fernández M, et al. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol Cell Proteomics*. 2009; 8: 172-89.
- Ruiz-Romero C, Calamia V, Rocha B, Mateos J, Fernández-Puente P, Blanco FJ. Hypoxia conditions differentially modulate human normal and osteoarthritic chondrocyte proteomes. *J Proteome Res*. 2010; 9(6): 3035-45.
- Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Interleukin-1beta-converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1beta and interleukin-18. *Arthritis Rheum*. 1999; 42(8): 1577-87.
- Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res*. 2001; 3(2): 107-13.
- Sandell LJ, Xing X, Franz C, Davies S, Chang LW, Patra D. Exuberant expression of chemokine genes by adult human articular chondrocytes in response to IL-1beta. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008; 16: 1560-71.
- Scharstuhl A, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Loss of transforming growth factor counteraction on interleukin 1 mediated effects in cartilage of old mice. *Ann Rheum Dis*. 2002; 61(12): 1095-8.
- Schlaak JF, Pfers I, Meyer Zum Buschenfelde KH, Marker-Hermann E. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clin Exp Rheumatol*. 1996; 14(2): 155-62.
- Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO J*. 1993; 12(8): 3095-104.
- Schumacher BL, Hughes CE, Kuettner KE, Caterson B, Aydelotte MB. Immunodetection and partial cDNA sequence of the proteoglycan, superficial zone protein, synthesized by cells lining synovial joints. *J Orthop Res*. 1999; 17(1): 110-20.
- Shakibaei M, John T, Schulze-Tanzil G, Lehmann I, Mobasheri A. Suppression of NF-

kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73: 1434-45.

- Shakibaei M, Csaki C, Nebrich S, Mobasheri A. Resveratrol suppresses interleukin-1beta-induced inflammatory signaling and apoptosis in human articular chondrocytes: potential for use as a novel nutraceutical for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol.* 2008; 76: 1426-39.
- Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res.* 2009; 53(1): 115-28.
- Shane Anderson A, Loeser RF. Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010; 24: 15-26.
- Shapiro IM, Golub EE, Kakuta S, Hazelgrove J, Havery J, Chance B, et al. Initiation of endochondral calcification is related to changes in the redox state of hypertrophic chondrocytes. *Science.* 1982; 217(4563): 950-2.
- Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity.* 2012; 36: 401-14.
- Smale G, Bendele A, Horton WE, Jr. Comparison of age-associated degeneration of articular cartilage in Wistar and Fischer 344 rats. *Lab Anim Sci.* 1995; 45(2): 191-4.
- Sokolove J, Lepus CM. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2013; 5(2): 77-94.
- Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, Curran RD, McIntyre LA, Georgescu HI, et al. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1991; 147(11): 3915-20.
- Staniek K, Nohl H. H(2)O(2) detection from intact mitochondria as a measure for one-electron reduction of dioxygen requires a non-invasive assay system. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1413(2): 70-80.
- Stefanovic-Racic M, Morales TI, Taskiran D, McIntyre LA, Evans CH. The role of nitric oxide in proteoglycan turnover by bovine articular cartilage organ cultures. *J Immunol.* 1996; 156(3): 1213-20.
- Stichtenoth DO, Thorén S, Bian H, Peters-Golden M, Jakobsson PJ, Crofford LJ. Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol.* 2001; 167(1): 469-74.
- Stockwell RA. The cell density of human articular and costal cartilage. *J Anat.* 1967; 101(Pt 4): 753-63.
- Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol.* 2008; 129(1): 33-43.

- Takayama K, Ishida K, Matsushita T, Fujita N, Hayashi S, Sasaki K, et al. SIRT1 regulation of apoptosis of human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(9): 2731-40.
- Tao HY, Wu CF, Zhou Y, Gong WH, Zhang X, Iribarren P, et al. The grape component resveratrol interferes with the function of chemoattractant receptors on phagocytic leukocytes. *Cell Mol Immunol.* 2004; 1(1): 50-6.
- Terkeltaub R, Johnson K, Murphy A, Ghosh S. Invited review: the mitochondrion in osteoarthritis. *Mitochondrion.* 2002; 1: 301-19.
- Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(3): 585-94.
- Tetlow LC, Woolley DE. Histamine and PGE(2) stimulate the production of interleukins -6 and -8 by human articular chondrocytes in vitro. 6. Human and clinical aspects of histamine. *Inflamm Res.* 2006; 55 (Suppl 1): S73-4.
- Thomas B, Thirion S, Humbert L, Tan L, Goldring MB, Berezat G, et al. Differentiation regulates interleukin-1 β -induced cyclo-oxygenase-2 in human articular chondrocytes: role of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem J.* 2002; 362 (Pt 2): 367-73.
- Thyagarajan A, Jiang J, Hopf A, Adamec J, Sliva D. Inhibition of oxidative stress-induced invasiveness of cancer cells by *Ganoderma lucidum* is mediated through the suppression of interleukin-8 secretion. *Int J Mol Med.* 2006; 18(4): 657-64.
- Trifunovic A. Mitochondrial DNA and ageing. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1757: 611-7.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003; 552: 335-44.
- Ungvari Z, Orosz Z, Labinsky N, Rivera A, Xiangmin Z, Smith K, et al. Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF- κ B activation in aged rat arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293: H37-47.
- Valcarcel-Ares MN, Riveiro-Naveira RR, Loureiro J, Vaamonde-García C, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, et al. Mitochondrial dysfunction induces an inflammatory, tissue-degrading, and angiogenic response in normal human synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 2013; (1846).
- Vaillancourt F, Morquette B, Shi Q, Fahmi H, Lavigne P, Di Battista JA, et al. Differential regulation of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase by 4-hydroxynonenal in human osteoarthritic chondrocytes through ATF-2/CREB-1 transactivation and concomitant inhibition of NF- κ B signaling cascade. *J Cell Biochem.* 2007; 100(5): 1217-31.
- van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB. In vivo protection

against interleukin-1-induced articular cartilage damage by transforming growth factor-beta 1: age-related differences. *Ann Rheum Dis*. 1994; 53(9): 593-600.

- Van Damme J, Bunning RA, Conings R, Graham R, Russell G, Opdenakker G. Characterization of granulocyte chemotactic activity from human cytokine-stimulated chondrocytes as interleukin 8. *Cytokine*. 1990; 2:106-11.
- Vang O, Ahmad N, Baile CA, Baur JA, Brown K, Csiszar A, et al. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One*. 2011; 6: e19881.
- Vergunst CE, van de Sande MG, Lebre MC, Tak PP. The role of chemokines in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol*. 2005; 34: 415-25.
- Vickers AE, Bentley P, Fisher RL. Consequences of mitochondrial injury induced by pharmaceutical fatty acid oxidation inhibitors is characterized in human and rat liver slices. *Toxicol In Vitro*. 2006; 20: 1173-82.
- Vuolteenaho K, Koskinen A, Kukkonen M, Nieminen R, Paivarinta U, Moilanen T, et al. Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage--mediator role of NO in leptin-induced PGE2, IL-6, and IL-8 production. *Mediators Inflamm*. 2009; 2009: 345838.
- Wallace DC, Fan W. The pathophysiology of mitochondrial disease as modeled in the mouse. *Genes Dev*. 2009; 23: 1714-36.
- Wallace KB, Starkov AA. Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000; 40: 353-88.
- Wang P, Zhu F, Konstantopoulos K. Prostaglandin E2 induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappaB activation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010; 298: C1445-56.
- Wang P, Zhu F, Konstantopoulos K. Interleukin-6 synthesis in human chondrocytes is regulated via the antagonistic actions of prostaglandin (PG)E2 and 15-deoxy-Delta(12,14)-PGJ2. *PLoS One*. 2011; 6: e27630.
- Watanabe H, Bohensky J, Freeman T, Srinivas V, Shapiro IM. Hypoxic induction of UCP3 in the growth plate: UCP3 suppresses chondrocyte autophagy. *J Cell Physiol*. 2008; 216(2): 419-25.
- Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 6735-41.
- Wei YH, Wu SB, Ma YS, Lee HC. Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Med J*. 2009; 32(2): 113-32.
- Wruck CJ, Fragoulis A, Gurzynski A, Brandenburg LO, Kan YW, Chan K, et al. Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. *Ann Rheum*

Dis. 2011; 70: 844-50.

- Yamada A, Uegaki A, Nakamura T, Ogawa K. ONO-4817, an orally active matrix metalloproteinase inhibitor, prevents lipopolysaccharide-induced proteoglycan release from the joint cartilage in guinea pigs. *Inflamm Res*. 2000; 49(4): 144-6.
- Yamada H, Kikuchi T, Nemoto O, Obata K, Sato H, Seiki M, et al. Effects of indomethacin on the production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human articular chondrocytes. *J Rheumatol*. 1996; 23(10): 1739-43.
- Yang KG, Raijmakers NJ, van Arkel ER, Caron JJ, Rijk PC, Willems WJ, et al. Autologous interleukin-1 receptor antagonist improves function and symptoms in osteoarthritis when compared to placebo in a prospective randomized controlled trial. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008; 16(4): 498-505.
- Yasuda T. Cartilage destruction by matrix degradation products. *Mod Rheumatol*. 2006; 16(4): 197-205.
- Young L, Katrib A, Cuello C, Vollmer-Conna U, Bertouch JV, Roberts-Thomson PJ, et al. Effects of intraarticular glucocorticoids on macrophage infiltration and mediators of joint damage in osteoarthritis synovial membranes: findings in a double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum*. 2001; 44(2): 343-50.
- Yuan GH, Masuko-Hongo K, Sakata M, Tsuruha J, Onuma H, Nakamura H, et al. The role of C-C chemokines and their receptors in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2001; 44(5): 1056-70.
- Yudoh K, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Catabolic stress induces expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha in articular chondrocytes: involvement of HIF-1 alpha in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005; 7: R904-14.
- Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 2010a; 464: 104-7.
- Zhang Z, Bryan JL, DeLassus E, Chang LW, Liao W, Sandell LJ. CCAAT/enhancer-binding protein beta and NF-kappaB mediate high level expression of chemokine genes CCL3 and CCL4 by human chondrocytes in response to IL-1beta. *J Biol Chem*. 2010b; 285: 33092-103.
- Zhang Z, Xing X, Hensley G, Chang LW, Liao W, Abu-Amer Y, et al. Resistin induces expression of proinflammatory cytokines and chemokines in human articular chondrocytes via transcription and messenger RNA stabilization. *Arthritis Rheum*. 2010c; 62(7): 1993-2003.
- Zhou S, Cui Z, Urban JP. Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modeling study. *Arthritis Rheum*. 2004; 50(12): 3915-24.
- Zhu F, Wang P, Kontogianni-Konstantopoulos A, Konstantopoulos K. Prostaglandin

(PG)D(2) and 15-deoxy-Delta(12,14)-PGJ(2), but not PGE(2), mediate shear-induced chondrocyte apoptosis via protein kinase A-dependent regulation of polo-like kinases. *Cell Death Differ.* 2010; 17: 1325-34.

LIBROS

- Aigner T, Van der Kraan P, Van den Berg W. Osteoarthritis and Inflammation-Inflammatory changes in Osteoarthritic synoviotherapy. En: Buckwalter J, Lotz M, Stoltz J-F, editores. *Osteoarthritis, Inflammation and Degradation: A Continuum*. Amsterdam: IOS Press; 2007. p. 219-235.
- Blanco-García FJ, Fernández Sueiro JL Artrosis, concepto, clasificación, epidemiología y patogenia. En: Pascual E, Rodríguez-Valverde V, Carbonell J, Gómez-Reino, directores. *Reumatología: Enfermedades del Aparato Locomotor*. Madrid: Arán; 1998. p. 1609-42.
- Blanco FJ. Inflamación en la artrosis En: Egido J, Gómez-Reino J, Herrero-Beaumont G, Rodríguez de la Serna A, directores. *Manual de inflamación*. Madrid: Medical and Marketing Communications; 1999 p. 339-54.
- Blanco FJ, López-Armada MJ, Rego I. Mitochondria and Chondrocytes: Role in Osteoarthritis. En: Buckwalter J, Lotz M, Stoltz J-F, editores. *Osteoarthritis, Inflammation and Degradation: A Continuum*. Amsterdam: IOS Press. 2007. p. 192-205.
- Benito P. Estructura y función del cartílago. En: Battle-Gualda E, Benito P, Blanco FJ, Martín E, editores. *Manual SER de la artrosis*. Sociedad Española de Reumatología. Madrid: IM&C; 2002. p. 33-42
- De Toro FJ, Galdo-Fernández F. Anatomía y biomecánica de la articulación humana. En: Battle-Gualda E, Benito P, Blanco FJ, Martín E, editores. *Manual SER de la artrosis*. Sociedad Española de Reumatología. Madrid: IM&C; 2002. p. 19-31.
- Edgar D. Molecular mechanisms of aging in mtDNA mutator mice. Tesis doctoral, Instituto Karolinska, Departamento del laboratorio de medicina. Estocolmo. 2011.
- Gabay O, Gosset M, Berenbaum. Prostaglandin E2 and Osteoarthritis: The role of Cyclooxygenases, Prostaglandin E synthases and 15-Prostaglandin dehydrogenases. En: Buckwalter J, Lotz M, Stoltz JF, editores. *Osteoarthritis, Inflammation and Degradation: A Continuum*. Amsterdam: IOS Press; 2007. p. 163-81.
- Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Inflammatory Factors Involved in Osteoarthritis. En: Buckwalter J, Lotz M, Stoltz J-F, editores. *Osteoarthritis, Inflammation and Degradation: A Continuum*. Amsterdam: IOS Press; 2007. p. 3-13.
- Trujillo-Martín E, Monfort-Faure. Mecanismos de destrucción y reparación del cartílago. En: Battle-Gualda E, Benito P, Blanco FJ, Martín E, editores. *Manual SER de la artrosis*. Sociedad Española de Reumatología. Madrid: IM&C; 2002. p. 43-61.



VIII. ANEXOS

Imagen obtenida de <http://www.photoree.com/photos/permalink/8062885-33932522@N07>

La elaboración de esta Tesis Doctoral ha generado los siguientes **artículos**,

⇒ **Carlos Vaamonde-García**, Romina R Riveiro-Naveira, Marta N Valcárcel-Ares, Laura Hermida-Carballo, Francisco J Blanco, María J López-Armada. *Mitochondrial dysfunction increases the inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes*. Arthritis Rheum. Sep;64(9):2927-36.

⇒ **Carlos Vaamonde-García**, Romina R Riveiro-Naveira, Marta N Valcárcel-Ares, Laura Hermida-Carballo, Jesús Álvarez-Loureiro, Eduardo López-Peláez, Alberto Centeno-Cortés, Francisco J Blanco, María J López-Armada. *The intraarticular injection of an inhibitor of complex V of mitochondrial respiratory chain induces a pathological response in rat knee joints*. En preparación.

⇒ **Carlos Vaamonde-García**, Jesús Álvarez-Loureiro, Romina R Riveiro-Naveira, Marta N Valcárcel-Ares, Laura Hermida-Carballo, Francisco J Blanco, María J López-Armada. *Resveratrol protects chondrocyte against cell death signalling pathways induced by mitochondrial dysfunction*. En elaboración.

Y comunicación en congresos,

⇒ **Vaamonde-García C**, Loureiro J, López-Peláez E, Centeno A, Riveiro-Naveira R, Valcarcel-Ares MN, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, López-Armada MJ. *The intraarticular injection of an inhibitor of complex V of mitochondrial respiratory chain induces a pathological response in rat knee joints*. En: 2013 American College of Rheumatology (ACR) – San Diego (25 - 30 Octubre 2013).

⇒ **Vaamonde-García C**, López-Peláez E, Centeno A, Riveiro-Naveira R, Valcarcel-Ares MN, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, López-Armada MJ. *Oligomycin, An Inhibitor of Complex V of Mitochondrial Respiratory Chain, Induces An Inflammatory Response in Rat Knee Joint*. En: 2013 World Congress on Osteoarthritis (OARSI) - Philadelphia, EEUU (18-21 Abril 2013).

⇒ **Vaamonde-García C**, Valcarcel-Ares MN, Riveiro-Naveira R, Blanco FJ, López-Armada MJ. *Inflammatory Response Is Modulated by Mitochondrial Dysfunction in Cultured Normal Human Chondrocyte*. En: 2010 World Congress on Osteoarthritis (OARSI) - Bruselas, Bélgica (23-26 Septiembre 2010).

⇒ **Vaamonde-García C**, Valcarcel-Ares MN, Riveiro-Naveira R, Blanco FJ, López-Armada MJ. *Inflammatory Response Is Modulated by Mitochondrial Dysfunction in Cultured Normal Human Chondrocytes*. En: 30th European Workshop for Rheumatology Research 2010 - Bamberg, Alemania (4 – 7 Marzo 2010).

⇒ **Vaamonde-García C**, Valcarcel-Ares MN, Riveiro-Naveira R, Lema B, Blanco FJ, López-Armada MJ. *Inflammatory Response Is Modulated by Mitochondrial Dysfunction in Cultured Normal Human Chondrocytes*. En: 2009 American College of Rheumatology (ACR) – Philadelphia (17 - 21 Octubre 2009).

⇒ **Vaamonde-García C**, Valcárcel-Ares MN, Riveiro-Naveira R, Lema B, Blanco FJ, López-Armada MJ. *Inflammatory response induced by cytokines is modulated by early damage of mitochondrial functions in cultured normal human chondrocytes*. En: European League Against Rheumatism (EULAR) - Copenhagen (10-13 Junio 2009).

Mitochondrial Dysfunction Increases Inflammatory Responsiveness to Cytokines in Normal Human Chondrocytes

Carlos Vaamonde-García, Romina R. Riveiro-Naveira, Marta N. Valcárcel-Ares, Laura Hermida-Carballo, Francisco J. Blanco, and María J. López-Armada

Objective. Alterations in mitochondria play a key role in the pathogenesis of osteoarthritis (OA). The role of inflammation in the progression of OA has also acquired important new dimensions. This study was undertaken to evaluate the potential role of mitochondrial dysfunction in increasing the inflammatory response of normal human chondrocytes to cytokines.

Methods. Mitochondrial dysfunction was induced by commonly used inhibitors. Interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor α (TNF α) were used as inflammatory mediators. IL-8 and cyclooxygenase 2 (COX-2) protein and messenger RNA (mRNA) expression and prostaglandin E₂ (PGE₂) levels were assessed. The chemotactic activity of neutrophils was assayed. Additionally, inhibitors of reactive oxygen species (ROS) and NF- κ B were used to identify possible inflammatory response pathways induced by mitochondrial dysfunction, and the effects of the natural antioxidant resveratrol were tested.

Results. Pretreatment with antimycin A or oligomycin (inhibitors of mitochondrial respiratory chain

complexes III and V, respectively) triggered a strong potentiation of IL-1 β -induced IL-8 mRNA and protein expression (mean \pm SEM at 18 hours 5,932 \pm 1,995 pg/50,000 cells for IL-1 β alone versus 16,241 \pm 5,843 pg/50,000 cells for antimycin A plus IL-1 β and 20,087 \pm 5,407 pg/50,000 cells for oligomycin plus IL-1 β ; P < 0.05). Similar results were observed with TNF α or when expression of the inflammatory mediator COX-2 or PGE₂ production was assessed. Mitochondrial dysfunction increased the chemotactic activity induced by cytokines, and ROS and NF- κ B inhibitors decreased the production of IL-8. Resveratrol significantly reduced the inflammatory response.

Conclusion. Our findings indicate that mitochondrial dysfunction could amplify the responsiveness to cytokine-induced chondrocyte inflammation through ROS production and NF- κ B activation. This pathway might lead to the impairment of cartilage and joint function in OA.

Osteoarthritis (OA), the most common age-related cartilage and joint disorder, is a degenerative disease characterized by degradation of the matrix and cell death resulting in the gradual loss of articular cartilage integrity (1,2). The chondrocyte, which is the only cell type present in mature cartilage, is responsible for repairing damaged tissue. Although the primary etiology of the disease is undetermined, OA is now believed to involve a disruption of cartilage homeostasis in which proinflammatory stimuli induce an increase in chondrocyte catabolic processes. Consequently, the role of inflammation in the progression of OA has acquired important new dimensions (3–5).

Accumulating evidence indicates that mitochondrial damage may play a significant role in the pathogenesis of OA (6–8). Recent ex vivo studies have demonstrated mitochondrial dysfunction in human OA chondrocytes, and analyses of mitochondrial electron

Supported by the Fondo Investigación Sanitaria, Spain (grants 06/1670, 06CP/00292, and 09/02340) and the Secretaría Xeral I+D+I (PXIB916357PR, INCITE 07PXI916207ES, INCITE 08E1R916069ES, INCITE 09E1R916139ES, and 10CSA916035PR). Mr. Vaamonde-García's work was supported by the Fondo Investigación Sanitaria, Spain (Contrato Técnico de Apoyo CA10/01497). Ms Riveiro-Naveira, Ms Valcárcel-Ares, and Ms Hermida-Carballo's work was supported by the Dirección Xeral I+D+I (grants PS09/56, Programa María Barbeito 2008, and IN845B2010/176, respectively). Dr. López-Armada's work was supported by the Fondo Investigación Sanitaria, Spain (Contrato Investigadores SNS 06CP/00292).

Carlos Vaamonde-García, BS, Romina R. Riveiro-Naveira, BS, Marta N. Valcárcel-Ares, BS, Laura Hermida-Carballo, Francisco J. Blanco, MD, María J. López-Armada, PhD: INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, Spain.

Address correspondence to María J. López-Armada, PhD, Aging and Inflammation Research Laboratory, INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, SERGAS, As Xubias 84, 15006-A Coruña, Spain. E-mail: Maria.Jose.Lopez.Armada@sergas.es.

Submitted for publication July 22, 2011; accepted in revised form April 12, 2012.

transport chain activity in these cells show decreased activity of mitochondrial respiratory chain complexes I, II, and III compared to normal chondrocytes (9). This mitochondrial dysfunction may affect several pathways that have been implicated in cartilage degradation, including defective chondrocyte biosynthesis and growth response, cartilage matrix calcification, and increased chondrocyte apoptosis, as well as augmentation of the inflammatory and matrix catabolism responses. Most of these processes are potentially related to the production of both reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) intermediaries (10–15). In this regard, a correlation has been found between the OA disease stage and the presence of oxidative stress (2,16–18).

As both the predominant site for ROS production and the prime target of these molecules, mitochondria play a key role in oxidative stress. High levels of oxidative stress may also underlie mitochondrial respiratory chain inhibition, ATP decrease, and mitochondrial DNA (mtDNA) mutation, all of which are related to the severity of the inflammatory process (14,19,20). In fact, an augmentation of oxidative mtDNA damage has been observed in OA cartilage (14,21).

Proinflammatory mediators may also alter mitochondrial function. Accordingly, we previously described the modulation of mitochondrial activity by interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF α), and nitric oxide in normal human chondrocytes (19,20). In this scenario, mitochondrial damage produces ROS and RNS that in turn reduce mitochondrial bioenergetics, favoring cell damage and death (14,18,22). In this sense, increasing experimental findings support a connection between mitochondrial dysfunction and inflammation (22–24). However, the role of mitochondrial dysfunction in OA-related inflammation is not yet fully understood.

The key mediators of inflammation, IL-8 and prostaglandin E₂ (PGE₂), are up-regulated in inflamed joint tissue (25–27). Both are spontaneously released by cartilage specimens from patients with OA at significantly higher levels than those released by normal cartilage specimens (4,27). Specifically, IL-8-mediated inflammation can promote cartilage degradation through matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) synthesis and altered chondrocyte differentiation and calcification in OA (28,29). PGE₂ contributes to hyperalgesia and the erosion of cartilage and juxta-articular bone (30). Overproduction of both mediators is likely induced by proinflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF α . Because it controls the transcription of a number of proinflammatory genes, the redox-sensitive NF- κ B pathway is considered a key regulator of tissue inflammation, in-

cluding IL-8 and cyclooxygenase 2 (COX-2) expression, in several cell types, notably OA chondrocytes (31).

Although current evidence indicates that mitochondrial dysfunction and inflammation are important players in the pathogenesis of OA, data are lacking to support the hypothesis that the connection between these processes amplifies and accelerates the mechanisms contributing to the impairment of cartilage and joint function. Recently, we demonstrated that mitochondrial dysfunction produced a slight increase in COX-2 expression and PGE₂ production in normal human chondrocytes in vitro (12). In this study, we investigated the effects of mitochondrial dysfunction on exacerbating the inflammatory response induced by cytokines in normal human chondrocytes, which can play a crucial role in governing the onset and progression of OA. Furthermore, the effect of antioxidant treatment on the above processes was examined.

MATERIALS AND METHODS

Chondrocyte culture. Normal human chondrocytes were obtained as previously described from the knee joints of 30 adult autopsy donors (mean \pm SD age 63 \pm 11 years; n = 16 men and 14 women) with no history of joint disease (20). Subcultures of chondrocytes isolated from cartilage were performed with trypsin-EDTA (Gibco Life Technologies), and first-passage cells were used for experiments. Chondrocytes were seeded into 6-well plates (Corning Costar) for RNA or flow cytometric analysis, 12-well plates (Costar) for chemotaxis assays, 96-well plates (Costar) for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of IL-8 and PGE₂, or 8-well chamber slides (Becton Dickinson) for immunocytochemistry studies. When cells reached confluence, they were made quiescent by 48-hour incubation in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco Life Technologies) containing 0.5% fetal calf serum (FCS; Gibco). After washing, the experiments were performed without FCS. All studies were performed strictly in accordance with current local ethics regulations.

Reagents and cell treatments. Antimycin A and oligomycin (both from Sigma-Aldrich) were used as inhibitors of mitochondrial respiratory chain complexes III and V, respectively (11,12,32,33). IL-1 β or TNF α (both from Sigma-Aldrich) was used to induce an inflammatory response. Chondrocytes were preincubated with antimycin A or oligomycin for 1 hour before adding IL-1 β (0.5, 1.5, or 5 ng/ml) or TNF α (5 ng/ml) for the necessary time period for RNA or flow cytometry analysis, ELISA for the determination of IL-8 and PGE₂ levels, chemotaxis assays, or immunocytochemistry studies. N-acetylcysteine (NAC; 40 mM) was used as an ROS scavenger, and BAY 11-7085 (5 μ M; Calbiochem) was used to prevent NF- κ B activation. The natural antioxidant resveratrol (50 or 250 μ M; Sigma-Aldrich) was tested for its effect as an inflammatory response modulator. BD GolgiStop (Becton Dickinson) containing monensin (0.7 μ l/ml) was used to prevent cytokine release in flow cytometry and immunohistochemistry studies.

Analysis of IL-8 and COX-2 messenger RNA (mRNA) expression. To isolate mRNA, TRIzol reagent was used according to the recommendations of the manufacturer (Invitrogen). Isolated mRNA from 5×10^5 cells was treated with DNase I (Invitrogen) and reverse transcribed with a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, according to the recommendations of the manufacturer (Roche Diagnostics). Real-time polymerase chain reaction analysis for IL-8, COX-2, and the housekeeping gene porphobilinogen deaminase was performed using a LightCycler 4800 SYBR Green I Master kit and a real-time LightCycler (Roche Diagnostics).

Analysis of IL-8 and COX-2 protein levels by flow cytometry. IL-8 and COX-2 protein expression measurements were obtained by flow cytometric analysis using a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson). Four hours prior to harvesting, BD GolgiStop (0.7 μ l/ml) was added to retain IL-8 within the cells. Stimulated cells (5×10^5 cells per well) were collected, washed with phosphate buffered saline (PBS), and fixed and permeabilized with 0.2% saponin (Sigma-Aldrich) in 4% paraformaldehyde (Panreac Química). Nonspecific binding was blocked by washing twice with PBS–1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich), and cells were incubated overnight with fluorescein isothiocyanate–labeled anti-IL-8 (Abcam) or phycoerythrin-labeled anti-COX-2 (Becton Dickinson).

IL-8 and PGE₂ assays. The levels of IL-8 and PGE₂ in culture supernatants from chondrocytes (5×10^4) were determined using commercially available ELISA kits for IL-8 (ImmunoTools) and PGE₂ (Amersham) according to the recommendations of the manufacturers. Data are expressed as picograms released per 50,000 cells. The working range was between 1.0 and 240 pg/ml for IL-8 and between 2.5 and 230 pg/well for PGE₂.

Chemotaxis assay. Polymorphonuclear leukocytes were isolated from the anticoagulated blood of healthy volunteers by Histopaque (Sigma-Aldrich) density-gradient centrifugation, gelatin sedimentation, and hypotonic lysis of red cells. The cells were suspended in 20 mM HEPES (Sigma-Aldrich), pH 7.4, at a concentration of 1×10^7 cells/ml. The chemotactic activity of culture supernatants was evaluated in 24-well Transwell chemotaxis chambers (3- μ m pore polycarbonate membrane; Corning Costar). Neutrophils (100 μ l HEPES; 1×10^6 cells) were placed in the upper chamber, and the lower well was loaded with 600 μ l of supernatants from cultured chondrocytes. The plate was incubated at 37°C in 5% CO₂ for 1 hour, and the migrating cells in the lower compartment were then counted by flow cytometry. Random migration was defined as the response to medium alone. In some experiments, supernatants were preincubated with 500 ng/ml IL-8 neutralizing antibody for 1 hour at 37°C before chemotactic activity was tested. Specific chemotaxis was represented by the mean number of migrating cells minus the mean number of randomly migrating cells. Controls included oligomycin in the lower compartment.

Immunocytochemistry. Chondrocytes (2×10^4 cells per well in 8-well chamber slides) were fixed with ice-cold acetone for 10 minutes. BD GolgiStop (0.7 μ l/ml) was added 4 hours prior to fixing the cells to retain IL-8 within the cells. After pretreatment with 1% hydrogen peroxidase–methanol to inactivate endogenous peroxidase, the cells were washed and incubated with rabbit anti-human IL-8 (Becton Dickinson) for 1 hour. The chambers were then washed with PBS, and

peroxidase-labeled goat anti-rabbit secondary antibody (Dako) was added and incubated for 30 minutes. The cells were then stained with Gill's hematoxylin no. 3 (Merck), washed, and examined using a microscope (Olympus BX61; Olympus Biosystems).

Statistical analysis. Data are expressed as the mean \pm SEM or representative results are shown, as indicated. Individual donor samples were studied in duplicate or triplicate; cells from different donors were not pooled for any procedure. A GraphPad Prism version 5 statistical software package was used to perform one-way analysis of variance and Friedman's test. Wilcoxon's paired comparison test was used to assess paired groups. *P* values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Mitochondrial inhibitors exacerbate the IL-8 and COX-2 expression induced by cytokines in normal human chondrocytes. To test the hypothesis that mitochondrial dysfunction modulates the inflammatory response induced by cytokines in normal human chondrocytes, we evaluated whether mitochondrial dysfunction amplifies the IL-8 expression induced by IL-1 β . First, the effect of mitochondrial inhibitors (antimycin A and oligomycin) on chemokine production was tested. Both antimycin A and oligomycin induced a faint but significant dose-dependent increase in IL-8 mRNA expression ($P \leq 0.05$; $n = 6$ experiments) (Figure 1A). After 4 hours of incubation, the maximum increase in IL-8 mRNA expression was observed with a concentration of 20 μ g/ml antimycin A or 20 μ g/ml oligomycin (mean \pm SEM increase of 38.01 ± 21.5 and 174.84 ± 95.83 , respectively, compared with a basal level set at 1). The positive control, IL-1 β (5 ng/ml), induced a 3.9×10^4 -fold increase in IL-8 mRNA expression (Figure 1A). When the concentration of IL-8 protein was evaluated by ELISA, the results obtained were consistent with those obtained for IL-8 mRNA expression (Figure 1B), with the highest levels observed at 18 hours of incubation with 20 μ g/ml antimycin A or 20 μ g/ml oligomycin ($P \leq 0.05$; $n = 6$ experiments).

Second, we demonstrated that pretreatment of chondrocytes with antimycin A or oligomycin intensified the IL-8 mRNA expression induced by IL-1 β , significantly lowering the threshold concentration of IL-1 β required for the expression of IL-8 ($P \leq 0.05$; $n = 6$ experiments) (Figure 2A). Similar results were observed when IL-8 protein expression induced by different doses of IL-1 β was evaluated by flow cytometry (Figure 2B). Antimycin A or oligomycin pretreatment produced modulation similar to that seen with a greater concentration of IL-1 β alone. These results were confirmed by

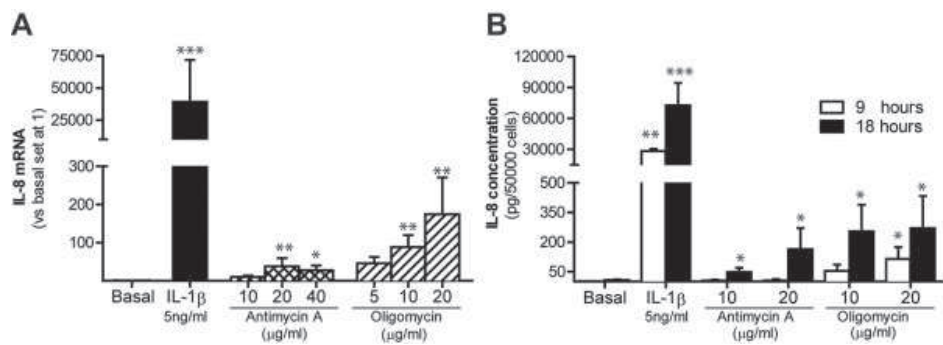


Figure 1. Antimycin A and oligomycin induce interleukin-8 (IL-8) mRNA and protein expression in cultured normal human chondrocytes. **A**, IL-8 mRNA expression, quantified by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction, in chondrocytes incubated under basal conditions, in the presence of the positive control IL-1 β (5 ng/ml), or with increasing doses of an inhibitor of mitochondrial respiratory chain complex III, antimycin A (10, 20, or 40 μ g/ml) or an inhibitor of mitochondrial respiratory chain complex V, oligomycin (5, 10, or 20 μ g/ml) for 4 hours. **B**, Levels of IL-8 released into the culture medium, determined by enzyme-linked immunosorbent assay, from chondrocytes stimulated with IL-1 β (5 ng/ml), antimycin A (10 or 20 μ g/ml), or oligomycin (10 or 20 μ g/ml) for 9 or 18 hours. Values are the mean \pm SEM (n = 6 independent experiments performed in duplicate). * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$ versus basal level.

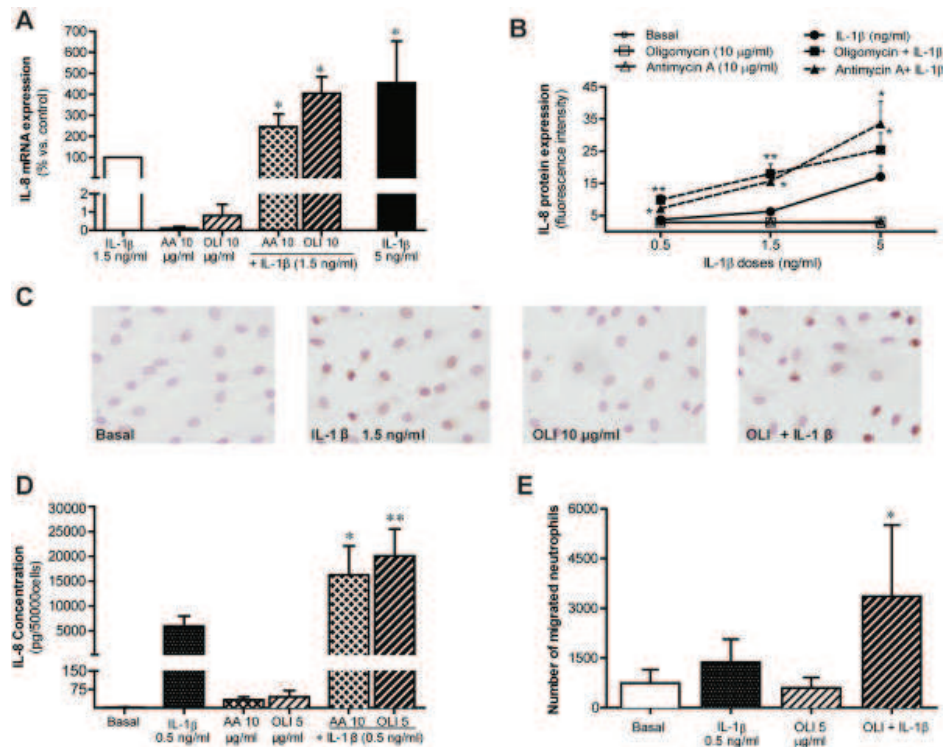


Figure 2. Mitochondrial dysfunction modulates the interleukin-8 (IL-8) expression induced by IL-1 β in normal human chondrocytes. **A**, IL-8 mRNA expression in chondrocytes incubated with 10 μ g/ml of either antimycin A (AA) or oligomycin (OLI) for 1 hour and then treated with 1.5 ng/ml IL-1 β for 4 hours. IL-1 β (5 ng/ml) was used as a positive control. Values are the mean \pm SEM (n = 6 independent experiments performed in duplicate). **B**, IL-8 protein expression, quantified by flow cytometry, in chondrocytes incubated under basal conditions or with increasing doses of IL-1 β (0.5, 1.5, or 5 ng/ml) for 8 hours, with or without pretreatment with antimycin A or oligomycin. Values are the mean \pm SEM median fluorescence intensity (n = 6 independent experiments). **C**, Immunofluorescence analysis of IL-8 expression. Results are representative of 3 independent experiments. Original magnification \times 200. **D**, IL-8 concentration, determined by enzyme-linked immunosorbent assay, in chondrocytes stimulated with medium alone or with the indicated stimuli for 18 hours. Values are the mean \pm SEM (n = 6 independent experiments performed in duplicate). **E**, Neutrophil chemotactic activity of supernatants collected from chondrocytes preincubated with oligomycin (5 μ g/ml) for 1 hour before stimulation with 0.5 ng/ml IL-1 β for 18 hours. Values are the mean \pm SEM (n = 6 independent experiments). * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$ versus IL-1 β alone.

immunocytochemistry (Figure 2C). Parallel results were obtained when IL-8 protein expression was quantified using ELISA (Figure 2D). As shown in Figure 2D, pretreatment with antimycin A and oligomycin resulted in increases up to 279% and 339%, respectively, over that induced by IL-1 β (0.5 ng/ml) alone (mean \pm SEM at 18 hours $5,932 \pm 1,995$ pg/50,000 cells for IL-1 β alone versus $16,241 \pm 5,843$ pg/50,000 cells for antimycin A plus IL-1 β and $20,087 \pm 5,407$ pg/50,000 cells for oligomycin plus IL-1 β).

Since we observed that mitochondrial dysfunction increased cytokine-induced chemokine expression, we used Transwell migration assays to investigate whether up-regulated IL-8 was functional and also resulted in an enhancement of polymorphonuclear cell chemotaxis. As shown in Figure 2E, pretreatment of chondrocytes with oligomycin resulted in increased chemotactic activity of neutrophils, showing a mean \pm SEM $218 \pm 41\%$ increase in cell migration compared with that induced by IL-1 β (0.5 ng/ml) alone. Incubation of chondrocyte supernatant with anti-IL-8 antibody resulted in a marked reduction of neutrophil migration (46.65% inhibition), indicating that chemotaxis activity was due at least in part to the production of IL-8. In these experiments, oligomycin failed to demonstrate intrinsic chemotactic activity at the concentration used (data not shown).

COX-2 is also a major player in the inflammatory process. We further demonstrated that mitochondrial dysfunction in normal human chondrocytes significantly intensified COX-2 gene and protein expression and PGE₂ production in cells exposed to IL-1 β ($P \leq 0.05$; $n = 5$ experiments) (Figure 3). Additionally, TNF α is, together with IL-1 β , one of the principal cytokines that drive cartilage destruction. We established that pretreatment of chondrocytes with oligomycin amplified the IL-8 expression induced by TNF α , at both the gene level (Figure 4A) and the protein (Figure 4B) level ($P \leq 0.05$; $n = 7$ experiments). Similar results were obtained for PGE₂ production (data not shown).

ROS and NF- κ B involvement in exacerbation of the inflammatory response to cytokines produced by mitochondrial dysfunction. The mitochondrion is the principal source and target of ROS. We found that preincubation with NAC, a ROS scavenger, for 1 hour significantly decreased the expression of IL-8 protein in cells pretreated with antimycin A or oligomycin before stimulation with IL-1 β ($P \leq 0.05$; $n = 4$ experiments) (Figure 5A). Because increased oxidative stress may lead to the up-regulation of redox-sensitive transcription factors such as NF- κ B, and because NF- κ B participates

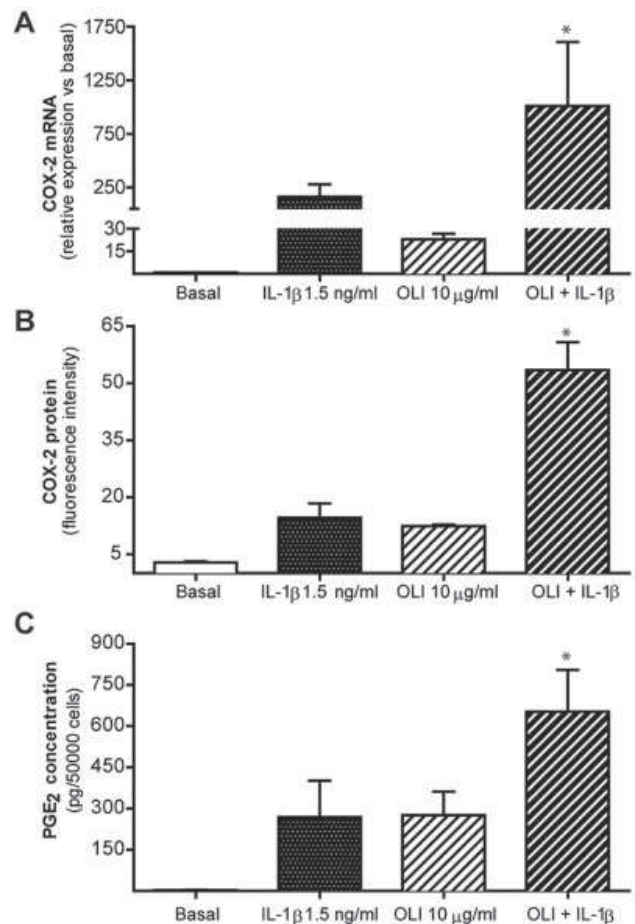


Figure 3. Mitochondrial dysfunction modulates the cyclooxygenase 2 (COX-2) mRNA and protein expression and prostaglandin E₂ (PGE₂) production induced by interleukin-1 β (IL-1 β) in normal human chondrocytes. **A**, COX-2 mRNA expression in chondrocytes incubated with 10 μ g/ml oligomycin (OLI) for 1 hour before treatment with 1.5 ng/ml IL-1 β for 4 hours. Values are the mean \pm SEM ($n = 5$ independent experiments performed in duplicate). **B**, COX-2 protein expression, quantified by flow cytometry, in chondrocytes incubated under basal conditions or with the indicated stimuli for 6 hours. Values are the mean \pm SEM median fluorescence intensity ($n = 4$ independent experiments). **C**, PGE₂ concentration, determined by enzyme-linked immunosorbent assay, in chondrocytes incubated under basal conditions or with the indicated stimuli for 18 hours. Values are the mean \pm SEM ($n = 10$ independent experiments performed in duplicate). * = $P \leq 0.05$ versus IL-1 β alone.

in the induction of IL-8 gene expression in several cell types, we preincubated chondrocytes with BAY 11-7085, an NF- κ B inhibitor. Preincubation with BAY 11-7085 for 1 hour significantly decreased the expression of IL-8 protein induced by pretreatment with mitochondrial respiratory chain inhibitors in IL-1 β -stimulated chondrocytes ($P \leq 0.05$; $n = 4$ experiments) (Figure 5B).

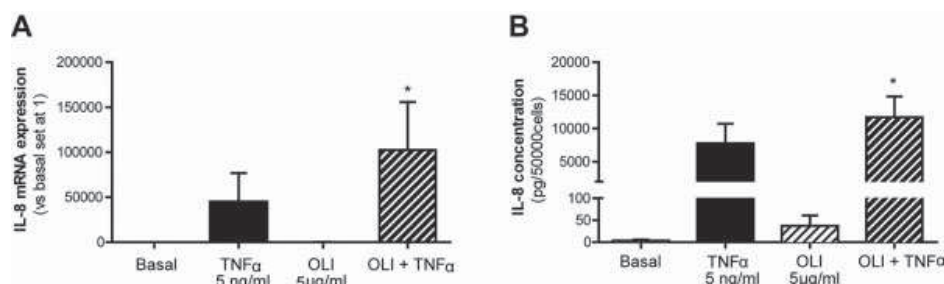


Figure 4. Mitochondrial dysfunction modulates the interleukin-8 (IL-8) mRNA and protein expression induced by tumor necrosis factor α (TNF α) in normal human chondrocytes. **A**, IL-8 mRNA expression in chondrocytes preincubated with 5 μ g/ml oligomycin (OLI) for 1 hour before stimulation with 5 ng/ml TNF α for 4 hours. **B**, IL-8 concentration, determined by enzyme-linked immunosorbent assay, in chondrocytes incubated under basal conditions or with the indicated stimuli for 18 hours. Values are the mean \pm SEM ($n = 7$ independent experiments performed in duplicate). * = $P \leq 0.05$ versus TNF α alone.

Because the goal of treatment strategies using antioxidants is to attenuate mitochondrial oxidative stress, we tested the ability of the natural antioxidant resveratrol to reduce the inflammatory response induced by the synergy between mitochondrial dysfunction and cytokines. Evaluation of IL-8 protein expression by flow cytometry showed that coincubation with resveratrol greatly reduced the IL-8 levels exacerbated in our model of synergy between mitochondrial dysfunction and IL-1 β ($P \leq 0.01$; $n = 4$ experiments) (Figure 6A). This effect of resveratrol was confirmed when IL-8 protein levels were assessed by ELISA ($P \leq 0.05$; $n = 6$ experiments) (Figure 6B). Furthermore, treatment with resveratrol caused a decrease in the chemotactic activity induced by IL-1 β in our model of mitochondrial dysfunction (92% inhibition) ($P \leq 0.05$; $n = 5$ experiments) (Figure 6C).

DISCUSSION

In recent years, accumulating evidence has indicated that mitochondrial damage may play a significant role in the pathogenesis of OA (6–8). In addition, the role of inflammation in the progression of OA has acquired important new dimensions (3,4). In this sense, increasing experimental data support a connection between inflammation and mitochondrial dysfunction (22–24). Importantly, we previously demonstrated that this mitochondrial dysfunction per se may generate low-grade inflammatory and matrix degradation processes in normal human chondrocytes in vitro (12,13). However, whether the preexisting mitochondrial dysfunction described in OA chondrocytes (9) intensifies cytokine-induced chondrocyte inflammation remained unknown.

In this study, we focused on the potential of mitochondrial dysfunction to increase the cytokine-

induced inflammatory response in normal human chondrocytes. This is the first study to show that mitochondrial dysfunction in normal human chondrocytes increases the production of inflammatory mediators such as IL-8, COX-2, and PGE $_2$ in response to cytokines through ROS generation and activation of the transcription factor NF- κ B. In addition, we showed that resveratrol significantly reduced this inflammatory response.

IL-8 and PGE $_2$ are 2 key players that are up-regulated in inflamed joint tissue (25,26,34,35) and in other age-related inflammatory diseases, including Alzheimer's disease, cancer, and atherosclerosis. In fact, cartilage specimens from patients with OA spontaneously released PGE $_2$ and expressed IL-8 mRNA in ex vivo culture at levels at least 50-fold higher and 15-fold higher, respectively, than those observed in normal cartilage (4,27). This up-regulation may occur secondary to the activation of inflammatory cytokines (27,36) but may also be independent of cytokine activation (37). With regard to the latter possibility, we recently demonstrated that the inhibition of mitochondrial respiratory chain activity induces a slight increase in COX-2 expression and PGE $_2$ production in normal human chondrocytes (12).

In the present study, when mitochondrial dysfunction was induced in normal chondrocytes with inhibitors of mitochondrial respiratory chain complexes III and V (antimycin A and oligomycin, respectively), a slight but significant increase in IL-8 mRNA and protein levels was also observed, which was dependent on both dose and incubation time. These findings are consistent with those obtained in human liver slices, where mitochondrial injury induced by pharmaceutical inhibitors of fatty acid oxidation led to a significant increase in IL-8 gene and protein expression (37). Mitochondrial

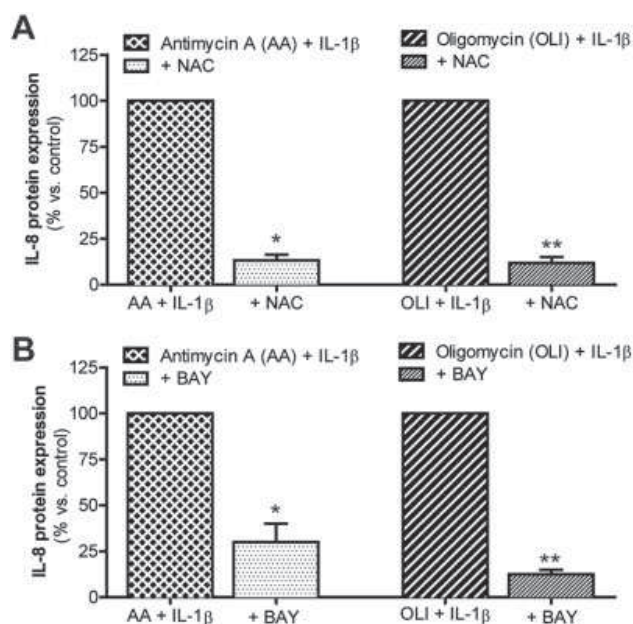


Figure 5. Reactive oxygen species and NF- κ B are implicated in the exacerbation of the inflammatory response to cytokines produced by mitochondrial dysfunction. **A**, Interleukin-8 (IL-8) protein expression, quantified by flow cytometry, in chondrocytes preincubated with the antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC; 40 mM) for 1 hour before treatment with antimycin A (AA; 10 μ g/ml) plus IL-1 β (1.5 ng/ml) or oligomycin (OLI; 10 μ g/ml) plus IL-1 β (1.5 ng/ml) for 8 hours. Values are the mean \pm SEM median fluorescence intensity ($n = 4$ independent experiments). * = $P < 0.05$; ** = $P \leq 0.01$ versus control without antioxidant treatment. **B**, IL-8 protein expression, quantified by flow cytometry, in chondrocytes preincubated with BAY 11-7085 (BAY; 5 μ M) for 1 hour before treatment with the indicated stimuli for 8 hours. Values are the mean \pm SEM median fluorescence intensity ($n = 4$ independent experiments). * = $P < 0.05$; ** = $P \leq 0.01$ versus control without BAY 11-7085 treatment.

dysfunction also induces PGE₂ liberation through 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation end product, which is produced abundantly in OA articular tissue and was recently identified as a potent catabolic factor in OA cartilage (38). In fact, 4-hydroxynonenal induces COX-2 expression and PGE₂ release in human OA chondrocytes (38).

To examine the potential role of mitochondrial dysfunction in increasing the vulnerability of cells to a cytokine-induced inflammatory response, we evaluated whether mitochondrial dysfunction in chondrocytes increases the level of IL-8 and PGE₂ production induced by cytokines. Numerous *in vitro* and *in vivo* studies have shown that IL-1 β and TNF α are the primary proinflammatory and catabolic cytokines involved in the initiation and progression of articular cartilage destruction (5,14,20). Furthermore, the increased levels of

catabolic enzymes, prostaglandins, ROS, nitric oxide, and other markers in OA fluids and tissue appear to be

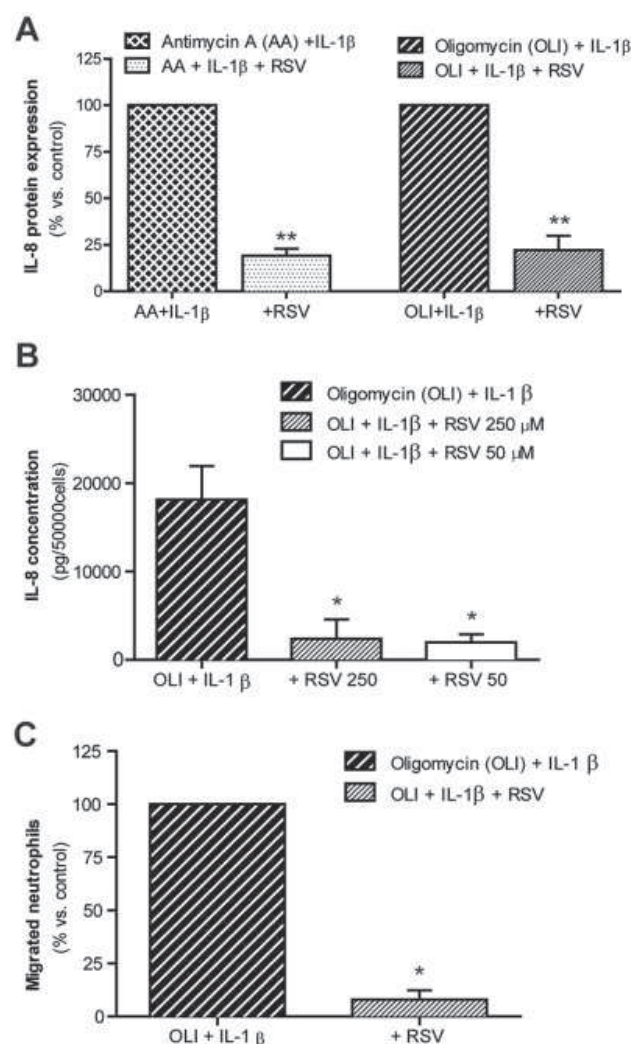


Figure 6. Resveratrol inhibits the inflammatory response to cytokines up-regulated by mitochondrial dysfunction. **A**, Interleukin-8 (IL-8) protein expression, quantified by flow cytometry, in normal human chondrocytes coincubated with the natural antioxidant resveratrol (RSV; 250 μ M) and treated with antimycin A (AA; 10 μ g/ml) plus IL-1 β (1.5 ng/ml) or oligomycin (OLI; 10 μ g/ml) plus IL-1 β (1.5 ng/ml) for 8 hours. Values are the mean \pm SEM ($n = 4$ independent experiments). **B**, IL-8 concentration, determined by enzyme-linked immunosorbent assay, in supernatants from chondrocytes incubated with oligomycin (5 μ g/ml) plus IL-1 β (0.5 ng/ml) in the absence or presence of resveratrol (250 or 50 μ M) for 18 hours. Values are the mean \pm SEM ($n = 6$ independent experiments performed in duplicate). **C**, Neutrophil chemotactic activity of supernatants collected from chondrocytes treated with oligomycin (5 μ g/ml) plus IL-1 β (0.5 ng/ml) in the absence or presence of resveratrol (50 μ M) for 18 hours. Values are the mean \pm SEM ($n = 5$ independent experiments). * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$ versus control without resveratrol treatment.

related to elevated levels of IL-1 β and TNF α . In the present study, antimycin A and oligomycin treatment of normal human chondrocytes resulted in synergistic amplification of the inflammatory response induced by the cytokines IL-1 β or TNF α . Hence, we observed that mitochondrial dysfunction increases the IL-8 expression and chemotactic activity induced by these cytokines. We also found that mitochondrial dysfunction aggravates the COX-2 expression and production of its metabolic end product, PGE₂, induced by IL-1 β .

The findings of the present study are supported by those obtained in other studies demonstrating that mitochondrial dysfunction increases the inflammatory response to different catabolic stimuli. In lung epithelial cells, preexisting mitochondrial dysfunction induced by antisense oligonucleotides to ubiquinol cytochrome c reductase core protein II in mitochondrial respiratory chain complex III increased mitochondrial ROS generation, resulting in a marked potentiation of ragweed pollen extract-induced accumulation of inflammatory cells in the airways (39). Interestingly, recent data also revealed that PGE₂ promotes IL-1 expression in articular chondrocytes, thus amplifying the local inflammatory process (30). In addition, the authors of that previous report showed that combined treatment of IL-1 with PGE₂ synergistically accelerated the expression of pain-associated molecules, including nitric oxide synthase and IL-6 (30). These findings confer even more physiologic relevance to our findings regarding the effects of mitochondrial dysfunction.

Our results demonstrate a significant mitochondrial dysfunction-related increase in the chondrocyte inflammatory response. Consistent with our results, OA chondrocytes are more responsive to IL-1 β than are normal chondrocytes. The spontaneous production of PGE₂ by human OA cartilage is notably greater than that by normal cartilage, and the addition of cytokines augments this effect to ~30-fold greater production compared to that observed in normal cartilage treated with cytokines (27). Similar effects have been described with proMMP-3 and proMMP-9 (40). Specifically, mitochondria from OA chondrocytes have been reported to be more sensitive to the DNA-damaging effects of the proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF α than are mitochondria from normal chondrocytes (14). Our results, and those of other investigators, suggest that mitochondrial dysfunction may contribute to the inflammatory phenotype observed in OA through the expression of inflammatory mediators.

In a previous study, we demonstrated that chondrocytes stimulated with antimycin A or oligomycin

produced ROS, triggering an inflammatory response that was significantly reduced by pretreatment with the ROS scavenger NAC (12). In this sense, the mitochondrial respiratory chain is one of the most important sites for ROS generation. The cumulative oxidative stress caused by ROS has been implicated as a key factor in OA. The present study demonstrated that when chondrocytes were treated with the ROS scavenger NAC, IL-8 expression induced by the synergy between mitochondrial dysfunction and cytokines was significantly reduced, confirming that ROS production is a key step in this inflammatory pathway. However, because NAC did not completely block the inflammatory response, other mitochondrial damage-associated molecules such as ATP, mtDNA, or RNS may also be involved in this inflammatory process (11,22,24). In other cell types, mitochondrial dysfunction also increased the generation of ROS, resulting in potentiation of cytotoxicity or inflammatory cell accumulation (39,41). TNF receptor type I mutant cells exhibited altered mitochondrial function with enhanced ROS generation, and pharmacologic blockade of mitochondrial ROS (i.e., with NAC) reduced inflammatory cytokine production induced by lipopolysaccharide (42). Additionally, antioxidant treatments can improve disease progression in animal models of OA (43).

Increased oxidative stress may lead to the up-regulation of redox-sensitive transcription factors, such as NF- κ B, that contribute to the proinflammatory phenotypic alterations in OA tissue, including the induction of IL-8 and COX-2 expression. In our study, the pharmacologic modulation of NF- κ B with BAY 11-7085, an inhibitor of NF- κ B activation, significantly prevented up-regulation of IL-8 expression, suggesting that NF- κ B may modulate the cytokine-induced IL-8 expression associated with mitochondrial dysfunction. Furthermore, we also found that oligomycin potentiated NF- κ B activation induced by IL-1 β (Vaamonde-García C, et al: unpublished observations). Other groups have found similar results, reporting enhanced sensitivity to activation of NF- κ B in the setting of mitochondrial dysfunction (41,44). However, other redox-sensitive transcription factors or other means of posttranscriptional regulation, such as modulation of mRNA degradation, could also be involved (45,46).

Because of the critical roles of oxidative stress and inflammation in the pathology of inflammatory diseases such as OA, a debate over various therapeutic strategies using antioxidant compounds is well under way. Resveratrol, a natural compound found in high concentrations in grape skin and red wine, shows great

promise as an antioxidant and antiinflammatory agent. In animal models, resveratrol protected against age-related diseases in mice and improved mitochondrial function (47,48). In vitro, this molecule has proven to have a number of beneficial effects in several cell types, i.e., by reducing NF- κ B activation, PGE₂ production, and free radical formation or by inducing mitochondrial biogenesis and protecting against chondrocyte apoptosis (49). In this study, we demonstrated that supplementation with this natural antioxidant significantly reduced the IL-8 levels and the chemotaxis induced by the synergy between mitochondrial dysfunction and cytokines. Similar findings have been reported in human monocytic U937 cells, in which resveratrol inhibited phorbol 12-myristate 13-acetate-induced IL-8 production at the protein and mRNA levels (50). Our results suggest that resveratrol may be a useful treatment strategy in OA.

On the whole, we have provided additional support to the hypothesis that a decline in mitochondrial function participates in the chondrocyte inflammatory phenotype observed in OA pathology. The results of the present study verify that mitochondrial dysfunction alone may generate low-grade inflammation in chondrocytes and demonstrates, for the first time, that a decline in mitochondrial function increases chondrocyte inflammatory responsiveness to cytokines, accelerating the mechanisms that may contribute to the impairment of cartilage and joint function in OA and aging. Future studies should be undertaken to evaluate whether resveratrol is a possible treatment of OA.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Ms Pilar Cal Purriños for expert secretarial assistance. We express appreciation to Lourdes Sanjurjo and Maria Dolores Velo from the Orthopedic Department of the Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC) and to Francisco Jose Pérez Llarena from the Microbiology Department of CHUAC for mycoplasma analysis.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. López-Armada had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Vaamonde-García, Riveiro-Naveira, Valcárcel-Ares, Blanco, López-Armada.

Acquisition of data. Vaamonde-García, Riveiro-Naveira, Valcárcel-Ares, Hermida-Carballo, López-Armada.

Analysis and interpretation of data. Vaamonde-García, Riveiro-Naveira, Valcárcel-Ares, López-Armada.

REFERENCES

- Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:971–9.
- Henrotin Y, Blanco FJ, Aigner T, Kurz B. The significance of oxidative stress in articular cartilage ageing and degradation. *Curr Rheumatol Rev* 2007;3:261–74.
- Abramson S. Inflammation in osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 2004;70:70–6.
- Attur MG, Dave M, Akamatsu M, Katoh M, Amin AR. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:1–4.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets [review]. *Arthritis Rheum* 2001;44:1237–47.
- Terkeltaub R, Johnson K, Murphy A, Ghosh S. Invited review: the mitochondrion in osteoarthritis. *Mitochondrion* 2002;1:301–19.
- Roach HI. The complex pathology of osteoarthritis: even mitochondria are involved [editorial]. *Arthritis Rheum* 2008;58:2217–8.
- Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:161–9.
- Maneiro E, Martin MA, de Andres MC, Lopez-Armada MJ, Fernandez-Sueiro JL, del Hoyo P, et al. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2003;48:700–8.
- Johnson K, Jung A, Murphy A, Andreyev A, Dykens J, Terkeltaub R. Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization. *Arthritis Rheum* 2000;43:1560–70.
- Johnson K, Svensson CI, Van Etten D, Ghosh SS, Murphy AN, Powell HC, et al. Mediation of spontaneous knee osteoarthritis by progressive chondrocyte ATP depletion in Hartley guinea pigs. *Arthritis Rheum* 2004;50:1216–25.
- Cillero-Pastor B, Carames B, Lires-Dean M, Vaamonde-Garcia C, Blanco FJ, Lopez-Armada MJ. Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2008;58:2409–19.
- Cillero-Pastor B, Rego I, Lopez-Armada MJ, Blanco FJ. Mitochondrial respiratory dysfunction regulates the metalloproteinases expression in human normal chondrocytes in culture [abstract]. *Arthritis Rheum* 2009;60 Suppl:S486.
- Kim J, Xu M, Xo R, Mates A, Wilson G, Pearsall At, et al. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18:424–32.
- Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets* 2007;8:333–45.
- Karan A, Karan MA, Vural P, Erten N, Tascioglu C, Aksoy C, et al. Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 2003;22:397–9.
- Yudoh K, Nguyen T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R380–91.
- Davies CM, Guilak F, Weinberg JB, Fermor B. Reactive nitrogen and oxygen species in interleukin-1-mediated DNA damage associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16:624–30.
- Maneiro E, Lopez-Armada MJ, de Andres MC, Carames B, Martin MA, Bonilla A, et al. Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2005;64:388–95.
- Lopez-Armada M, Carames B, Martin M, Cillero-Pastor B, Lires-Dean M, Fuentes-Boquete I, et al. Mitochondrial activity is

- modulated by $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ in normal human chondrocyte cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:1011–22.
21. Grishko V, Ho R, Wilson G, Pearsall AW IV. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:107–13.
 22. Escames G, Lopez LC, Garcia JA, Garcia-Corzo L, Ortiz F, Acuna-Castroviejo D. Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. *Hum Genet* 2012;131:161–73.
 23. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010;464:104–7.
 24. Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, et al. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol* 2011;32:157–64.
 25. Vergunst C, van de Sande M, Lebre M, Tak P. The role of chemokines in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 2005;34:415–25.
 26. Cecil DL, Rose DM, Terkeltaub R, Liu-Bryan R. Role of interleukin-8 in Pit-1 expression and CXCR1 -mediated inorganic phosphate uptake in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2005;52:144–54.
 27. Amin AR, Attur M, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ, Rediske J, et al. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage: influence of nitric oxide. *J Clin Invest* 1997;99:1231–7.
 28. Merz D, Liu R, Johnson K, Terkeltaub R. IL-8/CXCL8 and growth-related oncogene $\alpha/\text{CXCL1}$ induce chondrocyte hypertrophic differentiation. *J Immunol* 2003;171:4406–15.
 29. Borzi RM, Mazzetti I, Cattini L, Uguccioni M, Baggiolini M, Facchini A. Human chondrocytes express functional chemokine receptors and release matrix-degrading enzymes in response to C-X-C and C-C chemokines. *Arthritis Rheum* 2000;43:1734–41.
 30. Li X, Ellman M, Muddasani P, Wang JH, Cs-Szabo G, van Wijnen AJ, et al. Prostaglandin E_2 and its cognate EP receptors control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:513–23.
 31. Pulai J, Chen H, Im H, Kumar S, Hanning C, Hegde P, et al. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. *J Immunol* 2005;174:5781–8.
 32. Chowanadisai W, Bauerly K, Tchapanian E, Wong A, Cortopassi G, Rucker R. Pyrroloquinoline quinone stimulates mitochondrial biogenesis through cAMP response element-binding protein phosphorylation and increased $\text{PGC-1}\alpha$ expression. *J Biol Chem* 2010;285:142–52.
 33. Milner P, Wilkins R, Gibson J. The role of mitochondrial reactive oxygen species in pH regulation in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:735–42.
 34. Mazzetti I, Magagnoli G, Paoletti S, Uguccioni M, Olivetto E, Vitellozzi R, et al. A role for chemokines in the induction of chondrocyte phenotype modulation. *Arthritis Rheum* 2004;50:112–22.
 35. Lopez-Armada M, Sanchez-Pernaute O, Largo R, Diez-Ortego I, Palacios I, Egido J, et al. Modulation of cell recruitment by anti-inflammatory agents in antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:1027–30.
 36. Sandell LJ, Xing X, Franz C, Davies S, Chang LW, Patra D. Exuberant expression of chemokine genes by adult human articular chondrocytes in response to $\text{IL-1}\beta$. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16:1560–71.
 37. Vickers AE, Bentley P, Fisher RL. Consequences of mitochondrial injury induced by pharmaceutical fatty acid oxidation inhibitors is characterized in human and rat liver slices. *Toxicol In Vitro* 2006;20:1173–82.
 38. Vaillancourt F, Morquette B, Shi Q, Fahmi H, Lavigne P, Di Battista JA, et al. Differential regulation of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase by 4-hydroxynonenal in human osteoarthritic chondrocytes through ATF-2/CREB-1 transactivation and concomitant inhibition of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ signaling cascade. *J Cell Biochem* 2007;100:1217–31.
 39. Aguilera-Aguirre L, Bacsí A, Saavedra-Molina A, Kurosky A, Sur S, Boldogh I. Mitochondrial dysfunction increases allergic airway inflammation. *J Immunol* 2009;183:5379–87.
 40. Yuan GH, Masuko-Hongo K, Sakata M, Tsuruha JI, Onuma H, Nakamura H, et al. The role of C-C chemokines and their receptors in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:1056–70.
 41. Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF . *EMBO J* 1993;12:3095–104.
 42. Bulua AC, Simon A, Maddipati R, Pelletier M, Park H, Kim KY, et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1 -associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med* 2011;208:519–33.
 43. Nakagawa S, Arai Y, Mazda O, Kishida T, Takahashi KA, Sakao K, et al. N-acetylcysteine prevents nitric oxide-induced chondrocyte apoptosis and cartilage degeneration in an experimental model of osteoarthritis. *J Orthop Res* 2010;28:156–63.
 44. Ungvari Z, Orosz Z, Labinskyy N, Rivera A, Xiangmin Z, Smith K, et al. Increased mitochondrial H_2O_2 production promotes endothelial $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activation in aged rat arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H37–47.
 45. Rasheed Z, Akhtar N, Haqqi TM. Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 by receptor for advanced glycation end product-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κB in human osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2011;50:838–51.
 46. Wruck CJ, Fragoulis A, Gurzynski A, Brandenburg LO, Kan YW, Chan K, et al. Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2 -knockout mice. *Ann Rheum Dis* 2011;70:844–50.
 47. Elmali N, Baysal O, Harma A, Esenkaya I, Mizrak B. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation* 2007;30:1–6.
 48. Elmali N, Esenkaya I, Harma A, Ertem K, Turkoz Y, Mizrak B. Effect of resveratrol in experimental osteoarthritis in rabbits. *Inflamm Res* 2005;54:158–62.
 49. Dave M, Attur M, Palmer G, Al-Mussawir H, Kennish L, Patel J, et al. The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis via effects on mitochondrial polarization and ATP production. *Arthritis Rheum* 2008;58:2786–97.
 50. Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res* 2009;53:115–28.